

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 196

Travail du Laboratoire de Pharmacie et de Pharmacologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

**ACIDE GLYCURONIQUE
ET
GLYCUROCONJUGAISON**

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

le 27 Avril 1934

PAR

Marc CHAMBRON

Pharmacien

Ex-Interne Lauréat des Hôpitaux

Ex-Préparateur à la Faculté

Né le 10 Août 1908, à St-AGRÈVE (Ardèche)



LYON

BOSC Frères, M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

1934

**ACIDE GLYCURONIQUE
ET GLYCUROCONJUGAISON**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 196

Travail du Laboratoire de Pharmacie et de Pharmacologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

ACIDE GLYCURONIQUE
ET
GLYCUROCONJUGAISON

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

le 27 Avril 1934

PAR

Marc CHAMBRON

Pharmacien

Ex-Interne Lauréal des Hôpitaux

Ex-Préparateur à la Faculté

Né le 10 Août 1908, à St-AGRÈVE (Ardèche)



LYON

BOSC Frères, M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

1934

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE
Assesseur	M. A. MOREL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET
BARRAL, ROLLET, DOYON.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC.
Cliniques chirurgicales.....	PAVIOT.
Clinique obstétricale et Accouchements.....	TIXIER.
Clinique ophtalmologique	BERARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	VORON.
Clinique neurologique et psychiatrique.....	BONNET.
Clinique des maladies des enfants	NICOLAS.
Clinique des maladies des femmes	LEPINE (J.).
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	VILLARD.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	COLLET.
Clinique et prophylaxie de la tuberculose.....	GAYET.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	NOVE-JOSSERAND
Chimie biologique et médicale.....	COURMONT.
Chimie organique et Toxicologie.....	CLUZET.
Matière médicale et Botanique.....	FLORENCE.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....	MOREL.
Anatomie	MANCEAU.
Histologie	GUIART.
Physiologie	LATARJET.
Pathologie externe	POLICARD.
Pathologie interne	HERMANN.
Pathologie et Thérapeutique générales.....	LERICHE.
Anatomie pathologique	FROMENT.
Chirurgie opératoire	CADE.
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie.....	FAVRE.
Médecine légale	PATEL.
Hygiène	ARLOING (F.).
Thérapeutique	Etienne MARTIN.
Pharmacie et Pharmacologie.....	ROCHAIX.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	SAVY.
	LEULIER.
	PIERY.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie.....	MM. CONDAMIN.
Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale.....	THEVENOT (Léon)
Chargé d'un cours d'Embryologie.....	NOEL.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Chirurgie expérimentale.....	MM. TAVERNIER.
Stomatologie	PONT.

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
MAZEL	WERTHEIMER	EPARVIER	CREYSSSEL
DUMAS	GATE	GUILLEMINET	DE ROUGEMONT
DUFOURT	DECHAUME	MORENAS	PAUPERT-
DEVIC	BERNHEIM	REBATTU	RAVAULT
GABRIELLE	POLLOSSON	REVOL	PIGEAUD
MARTIN (Joseph)	CHAMBON	ENSELME	PONTHUS
ROCHET (Ph.)	CIBERT	SEDALLIAN	MALMEJAC

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. LEULIER, président : MANCEAU, assesseur,
CHAMBON et REVOL



La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MON PÈRE
Pharmacien de 1^{re} classe
Ex-Interne des Hôpitaux

A MA MÈRE

Faible témoignage de ma bien vive
affection et de ma profonde gratitude.

A MON FRÈRE

A MA SŒUR

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. LEULIER
Professeur de Pharmacie et de Pharmacologie
Chevalier de la Légion d'Honneur

A MES JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MANCEAU
Professeur de Matière médicale et de Botanique
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ M. CHAMBON
Pharmacien des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ L. REVOL
Pharmacien des Asiles

A MES MAÎTRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
ET DES HÔPITAUX DE LYON

A MES CAMARADES D'INTERNAT

Avant-propos

Il est peu de questions, croyons-nous, qui aient donné lieu à des affirmations aussi contradictoires que celles de l'acide glycuronique et de la glycuconjugaison, tant du point de vue chimique, que physiologique et surtout clinique. En ce qui concerne ce dernier, deux écoles, en France, s'affrontent : celle de Roger, Chiray et leurs collaborateurs, et celle de Brûlé et Schmid. La première admet que l'épreuve de la glycuronurie spontanée ou provoquée constitue un bon test de la valeur fonctionnelle du foie, alors que Brûlé et Schmid concluent que cette épreuve n'est pas susceptible de nous renseigner sur la fonction de cette glande .

Il était donc intéressant de poursuivre des études sur cette question. C'est précisément le point de départ des recherches que notre Maître, M. le Professeur LEULIER voulut bien nous confier. Nous nous sommes rapidement aperçu que la cause fondamentale de ces divergences provenait de l'emploi de méthodes analytiques non spécifiques. Une revue des travaux sur l'acide glycuronique allait nous apprendre qu'il n'existait aucune méthode vraiment au point et que la plupart n'étaient pas étalonnées par rapport à des produits purs, étant données les difficultés d'ob-

tention. Nous avons donc cherché à étudier une méthode pratique de préparation d'un conjugué. D'autre part, nos investigations nous ayant permis de faire une bibliographie de la question, nous avons cru utile de rassembler ici les principaux faits relatifs à l'acide glycuronique, épars dans un grand nombre de revues pour la plupart étrangères.

Avant de mettre le point final à cette thèse, il nous reste un devoir particulièrement agréable à remplir, c'est celui de remercier ici respectueusement, mais très sincèrement, tous nos Maîtres qui ont contribué, durant nos cinq années d'études, à notre formation professionnelle.

Notre Maître, M. le Professeur LEULIER, a bien voulu nous admettre dans son laboratoire et nous a fait le grand honneur de nous élever au grade de moniteur de travaux pratiques, puis de préparateur de cours ; nous lui en sommes profondément reconnaissant. Nous nous souviendrons toujours de la bienveillance et de la grande bonté qu'il nous a toujours témoignées. Il restera pour nous l'exemple d'une activité scientifique incessante. Nous le prions de bien vouloir nous considérer comme un de ses élèves les plus sincèrement attachés.

M. le Professeur MANCEAU, en nous faisant l'honneur d'être notre juge, nous donne une nouvelle preuve de la sollicitude qu'il nous a toujours manifestée pendant le cours de nos études. Il ne nous a ménagé ni ses encouragements, ni ses précieux conseils. Qu'il veuille bien accepter nos sentiments de respectueuse gratitude.

C'est dans le service de M. le Professeur agrégé CHAMBON que nous avons commencé notre premier semestre d'internat. Le temps passé auprès de lui, soit à l'Hôtel-Dieu, soit dans les clairs laboratoires de Grange-Blanche, restera comme un de nos meilleurs souvenirs. Nous avons eu maintes fois recours à sa grande compétence ; il nous a toujours accueilli avec beaucoup de bienveillance. Nous le prions de croire à notre profonde reconnaissance.

M. le Professeur agrégé REVOL a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury. Nous avons eu l'avantage de l'avoir comme Conférencier d'Internat. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance pour l'intérêt qu'il nous porte.

Nous prions M. le Professeur agrégé J. ROCHE de bien vouloir trouver ici, avec notre respectueux souvenir, l'expression de toute notre reconnaissance.

M. le Docteur FOUILLOUZE, pharmacien des Hôpitaux, nous a initié aux techniques de chimie biologique. Il nous a, au cours de nos études, aimablement ouvert l'accès de son laboratoire. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive reconnaissance.

Nous avons eu la faveur de faire un semestre d'internat à l'hôpital de l'Antiquaille, auprès de M. le Docteur RIZARD, Pharmacien des Hôpitaux. Nous le prions de croire à notre respectueux et fidèle attachement.

Nous ne saurions manquer de rappeler ici quelle respectueuse affection nous portons à M. BOURCET, Inspecteur des Pharmacies. Dès le début de nos études, il a bien voulu s'intéresser à nous. Nous lui exprimons ici notre très sincère gratitude.

Nous avons passé un semestre d'internat dans le service de M. le Professeur FROMENT, à l'Hôtel-Dieu. Il a bien voulu nous permettre de collaborer modestement avec lui dans quelques-unes de ses recherches. Nous n'oublierons jamais l'accueil que nous avons reçu auprès de lui. Qu'il veuille bien croire à notre respectueuse reconnaissance.

Nous voulons remercier vivement M. le Professeur agrégé CHALIER pour le très aimable accueil qu'il nous a réservé dans son service des contagieux.

Nous remercions également MM. les Professeurs NICOLAS et SAVY, et M. le Professeur agrégé GARIN pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu nous témoigner.

Notre camarade DORCHE, Pharmacien des Hôpitaux, a bien voulu se charger des dosages de carbone, qui nous étaient nécessaires. Nous lui exprimons notre sincère reconnaissance.

Nous remercions vivement M. le Professeur EHR-
LICH, de Breslau, et M. F. WEINMANN, pour leur envoi gracieux de lactone glycuronique, ainsi que M. BALL, Directeur de l'Ecole Vétérinaire de Lyon, et M. TAP-
PERNOUX, Professeur à la même Ecole, pour leur grande amabilité à notre égard.

Nos remerciements iront enfin à nos camarades de l'Internat de l'hôpital de la Charité, et en particulier à notre ami SIMON, pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée au cours de la correction des épreuves.

ACIDE GLYCURONIQUE ET GLYCUROCONJUGAISON

Introduction

Historique

EVOLUTION DES RECHERCHES SUR L'ACIDE GLYCURONIQUE

C'est en 1875 que Musculus et de Mermé [159-160], dans une communication à l'Académie des Sciences, décrivirent une substance que l'on peut déceler après administration d'hydrate de chloral, et qu'ils proposèrent de nommer acide urochloralique. Il s'agissait d'une substance acide, qui précipitait par l'acétate de plomb basique, déviait la lumière polarisée à gauche et réduisait l'oxyde cuivrique sous l'influence de la chaleur.

En 1877, Wiedemann [287], au cours de ses études sur la pharmacologie du camphre, avait été frappé par le fait que le chien supportait sans inconvénient de grandes quantités de ce corps et que les phénomènes d'intoxication, extrêmement rares, n'étaient que très passagers. D'autre part, il avait constaté que l'élimination du camphre ne se faisait pas remarquer par

une odeur spéciale de l'haleine ou des urines. Il conclut de ces expériences que le camphre devait être facilement transformé dans l'organisme et que ce produit de transformation devait être éliminé par les urines. Il réussit en effet à isoler de ce liquide un corps présentant une réaction acide, précipitable par le sous-acétate de plomb ammoniacal, ne fermentant pas, mais réduisant à chaud l'oxyde cuivrique alcalin, et qui ne présentait aucune odeur pouvant rappeler celle du camphre. Celui-ci subissait donc dans l'organisme des transformations profondes qui l'amenaient sous une forme possédant des propriétés très différentes. Mais il ne fut pas possible à l'époque d'identifier cette substance.

Des constatations analogues furent faites par Jaffé [127] sur des urines après ingestion d'orthonitrotoluène; il put en isoler une substance acide, déviant fortement à gauche la lumière polarisée, réduisant les solutions alcalines de bismuth et d'argent, mais ne fermentant pas. Par analogie avec l'acide urochloralique de Musculus, il la nomma acide uronitrotoluénique. Il montra que dans ce cas le composé éliminé par l'urine résulte de l'union d'un acide de constitution $C^6H^{10}O^7$ avec l'alcool orthonitrobenzylique provenant de l'oxydation, *in vivo*, du nitrotoluène. Jaffé émit en outre l'idée que l'acide urochloralique résultait d'une combinaison analogue du chloral avec le même acide $C^6H^{10}O^7$. Cet auteur considéra cet acide hypothétique comme un produit d'oxydation du glucose par transformation de la fonction alcool primaire en fonction acide, et lui attribua les caractères d'un acide aldéhyde.

Mais c'est à Schmiedeberg et Meyer [248] que revient le mérite d'avoir, l'année suivante, obtenu ce corps à l'état de pureté.

Etudiant le produit isolé par Wiedemann, ils le trouvèrent composé de trois fractions :

1° Une substance acide cristallisable dont ils fixèrent la composition correspondant à la formule $C^{16}H^{24}O^8$ et qu'ils proposèrent de nommer acide α -camphoglycuronique.

2° Une substance isomère de la première, mais non cristallisable, qu'ils nommèrent acide β -camphoglycuronique.

3° Enfin un acide amorphe, contenant de l'azote dans sa molécule, nommé acide uramido-camphoglycuronique et dont la nature n'a pas été établie avec certitude.

En traitant ces corps à l'ébullition par des acides étendus, ils démontrèrent que les deux premières fractions se dédoublaient en deux nouvelles substances, l'une qu'ils reconnurent comme un produit d'oxydation du camphre, et qu'ils nommèrent camphérol, et l'autre qu'ils caractérisèrent comme un acide ou plutôt l'anhydride d'un acide de composition $C^6H^8O^6$. Ils étudièrent ce corps : il est cristallisable bien soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool, il dévie la lumière polarisée à droite, il réduit rapidement à chaud l'oxyde cuivrique. Ils essayèrent d'élucider sa constitution chimique et en firent soit un acide cétonique, soit un acide aldéhyde peut-être dérivé du glucose.

Ces auteurs venaient ainsi de découvrir une nouvelle

substance chimique à laquelle ils donnèrent le nom d'acide glycuronique.

Voici la technique qui leur permit d'obtenir ce nouveau composé :

On fait bouillir au réfrigérant ascendant une solution contenant de 5 à 8 % d'acide camphoglycuronique et 5 % d'acide chlorhydrique ; le dédoublement s'opère assez lentement et il est bon d'enlever toutes les deux heures, à l'aide de l'éther, le camphérol formé. Le liquide brunit peu à peu, il se dégage de l'anhydride carbonique et l'acide glycuronique se décompose en partie. On neutralise alors le produit par du carbonate de plomb, on le concentre dans le vide et on précipite le sel de plomb par addition d'alcool.

Le précipité redissous dans l'eau et soumis à l'évaporation lente, fournit du glycuronate de plomb, qui quelquefois cristallise en petits prismes incolores ; d'autres fois, il reste à l'état de masse sirupeuse.

En décomposant le sel plombique par l'hydrogène sulfuré et abandonnant la solution à l'évaporation sur l'acide sulfurique, on aperçoit quelquefois la présence de fines aiguilles qui constituent probablement l'acide glycuronique ; mais, en définitive, le résidu sirupeux laisse déposer de grands cristaux brillants de la formule d'un anhydride glycuronique $C^6H^8O^6$. Ce composé se présente sous la forme de cristaux clinorhombiques qui, à l'air humide, tombent en déliquescence.

Deux sels avaient été préparés : le sel de plomb et celui de baryum. Les auteurs admettent qu'ils dérivent probablement de l'acide glycuronique libre $C^6H^{10}O^7$ qu'il leur a été impossible de préparer à l'état cristalli-

sé. Le corps obtenu dans la préparation précédente est en réalité au point de vue chimique l'anhydride interne ou lactone, encore appelé glycurone.

Reprenant ses recherches sur l'acide urochloralique qu'il avait isolé avec Musculus, Von Méring [161] montra enfin que c'est non pas le chloral lui-même qui se copule avec l'acide de Schmiedeberg, mais son produit de réduction, l'alcool trichloréthylque. Il établit ainsi la constitution de l'acide urochloralique de formule $C^8H^{11}Cl^3O^7$ que les acides minéraux dilués hydrolysent suivant l'équation :



A la suite de la découverte de Schmiedeberg, les recherches sur l'acide glycuronique se multiplièrent. On reconnut que toute une série de substances étaient capables de se combiner avec cet acide dans l'organisme. Le phénol, le phénétol, le xylol, l'hydrate de butychloral, le benzène monochloré ou monobromé, le dichlorobenzène furent successivement étudiés.

En 1882, Spiegel [249] communiqua le résultat de ses recherches sur l'acide euxanthique, substance qui se trouve à l'état de sel magnésien et calcaire dans le jaune indien naturel ou « purree » qu'on retire du dépôt de l'urine des vaches qui, dans l'Inde, mangent des feuilles de manguier. Ce colorant avait déjà été étudié par Stenhouse [250] et par Erdmann [57] qui réussirent à en isoler une substance nommée euxan-

thone et un acide qu'ils appelèrent acide hamathionique. Dans cet acide, Schmidt [251] put reconnaître la présence d'une substance réductrice, substance dont Baeyer [13] confirma l'existence et pour laquelle il établit la formule $C^6H^{10}O^7$. Spiegel réussit à isoler cette substance et établit son identité avec l'acide glycuronique découvert par Schmiedeberg. Dans un travail d'ensemble, Thierfelder [273] résuma les principaux caractères alors connus de l'acide ou plus exactement de la lactone glycuronique, décrivit son mode d'obtention à partir de l'acide euxanthique, la préparation de quelques glycuronates, ainsi que la description d'un certain nombre de combinaisons, en particulier avec les hydrazines aromatiques.

Il était donc maintenant démontré que cet acide formait un élément constant de toute une série de substances lévogyres, qui apparaissent dans l'urine de l'homme et des animaux à la suite de l'ingestion d'un grand nombre de composés organiques. Ceux-ci sont transformés dans l'économie en dérivés qui sont ensuite combinés, « conjugués » avec cet acide avant d'être éliminés.

La conjugaison glycuronique était désormais établie. Étudiée sur un grand nombre de composés appartenant aux séries chimiques les plus diverses, elle fut bientôt reconnue comme constituant l'un des mécanismes physiologiques de l'élimination de produits normaux de l'organisme tels que phénol, scatol, indol, etc...

Les recherches de nombreux chimistes parmi lesquels il convient de signaler particulièrement Fischer,

Neuberg, Thierfelder, P. Mayer, Tollens, etc..., permirent de jeter plus de clarté sur de nombreux points encore obscurs. La constitution chimique de l'acide fut plus complètement élucidée par ses relations avec l'acide saccharique, le glucose et le gulose. Des recherches furent effectuées concernant les réactions et les constantes physiques de la lactone et de ses composés, qui permirent de mettre en évidence ces corps dans de nombreux liquides physiologiques tels que l'urine normale, le sang, etc... (Bernier [18]). Mais c'est surtout la chimie des conjugués glycuroniques qui bénéficia de ces études. Les travaux d'un grand nombre d'auteurs permirent de constituer une liste imposante des corps susceptibles d'être éliminés sous cette forme. L'étude chimique de ces glucosides spéciaux fut entreprise en même temps que furent codifiées peu à peu les règles de la conjugaison glycuronique : On démontra que la copule doit, pour se conjuguer, posséder au moins un oxhydryle alcoolique ou phénolique ; ce n'est qu'après un phénomène préalable d'oxydation ou de réduction, réalisé *in vivo*, que les molécules sans oxhydryle peuvent devenir aptes à la conjugaison glycuronique. D'autre part, l'absence d'acide glycuronique libre dans l'organisme animal, ainsi que la difficulté de concevoir une oxydation de la fonction alcool primaire du glucose en acide correspondant sans atteinte égale de la fonction aldéhyde, ont conduit Sundwick, puis Fischer et Piloty [65] à proposer une hypothèse sur le mécanisme de la production des conjugués. Cette opération s'effectuerait en deux temps, la copule apte à la conjugaison se combinerait au glucose pour

former un glucoside ordinaire, puis celui-ci, à son tour, s'oxyderait en conjugué glycuronique.

L'ensemble de ces recherches avait donc permis d'établir certains faits sur des bases solides. Mais de nombreux points, comme la préparation, beaucoup de propriétés physiques et chimiques ainsi que les réactions qualitatives et quantitatives nécessitaient encore des études plus approfondies.

C'est à cet état de nos connaissances sur ce corps que se placent les travaux effectués en France par le Professeur Roger et ses collaborateurs, sur l'acide glycuronique en clinique.

Il semble ressortir des travaux d'Embden [58] que la combinaison de l'acide glycuronique avec une substance ingérée se fait au niveau du foie. De plus, il semble exister une relation entre la réserve glycogénique de cette glande et la formation d'acide glycuronique. En effet, quand la réserve glycogénique baisse, la glycuronurie diminuerait. C'est ce que l'on constaterait chez les individus soumis au jeûne. On peut dès lors admettre que les affections du foie entraînent une diminution de cette fonction synthétique et que cette diminution est proportionnelle à l'intensité des lésions du parenchyme hépatique.

Il faut surtout citer dans cet ordre d'idées les nombreux travaux, en particulier de Roger, Chiray et Caille, d'une part, et de Brulé et ses collaborateurs et Schmid [254] d'autre part. Ces auteurs sont arrivés à des conclusions exactement contradictoires. Ces différences proviennent en grande partie, ainsi que nous le verrons par la suite, de l'insuffisance des méthodes

analytiques employées provenant d'une connaissance chimique incomplète et imprécise de la substance qu'il s'agissait de déterminer ; résultat qui eut pour effet de faire abandonner presque complètement cette épreuve. L'acide glycuronique n'était plus considéré que comme une substance d'un rôle physiologique bien minime. Il était nécessaire de reprendre l'étude chimique de l'acide glycuronique.

C'est précisément à cette tâche que se sont surtout attachés les chercheurs dans les travaux récents.

Dans un mémoire paru en 1925, Ehrlich et Rehorst [59] annonçaient qu'ils étaient arrivés à préparer l'acide glycuronique libre à l'état cristallisé, mettant ainsi en évidence un corps non décrit jusqu'à présent. On parvenait ainsi à obtenir cet acide libre plus de quarante ans après la découverte de Schmiedeberg et Meyer, montrant ainsi toutes les difficultés rencontrées dans l'étude chimique de cette substance si instable. Quatre ans plus tard [60] ils modifiaient leur procédé d'obtention et déterminaient d'une façon précise les principales propriétés physiques et chimiques de cet acide ainsi que celles de ses principaux sels et établissaient les relations et les conditions de formation de l'acide et de sa lactone.

C'est à partir de la découverte de Ehrlich et Rehorst que se sont surtout développées les recherches sur la question. Il faut surtout citer les importants travaux de Quick, ses études sur les procédés de détermination quantitative, sur la préparation de l'acide cristallisé, la physiologie de ce corps, son origine dans l'organisme et ses relations avec le métabolisme des glucides

et celui des lipides, ses rapports avec les mécanismes de détoxication, etc..., recherches qui, sans donner la solution de tous ces problèmes, apportaient des éclaircissements intéressants.

En même temps se poursuivaient toute une série de recherches de chimie végétale. L'acide glycuronique, que l'on avait cru se trouver exclusivement dans le règne animal, était rencontré comme constituant de certaines hémicelluloses ; on le mettait en évidence dans les mucilages. Rehorst [237] le caractérisait dans certaines saponines, tandis que deux auteurs américains, Butler et Cretcher [14] démontraient qu'il constituait un des éléments fondamentaux de la gomme arabique. Toutes ces substances pouvaient désormais être rangées sous une dénomination commune, celle de « polyuronides », terme proposé par Candlin et Schryver [41] et une nouvelle terminologie s'élaborait pour désigner les complexes glycuroniques. Quelques années auparavant, Ehrlich [61] avait mis en évidence un isomère de l'acide glycuronique, l'acide galacturonique, comme constituant des pectines. Un autre isomère, dérivé du mannose, l'acide mannuronique, était préparé par Schoeffel et Link [295] à partir du *Fucus serratus*. Ces trois corps sont des représentants d'une nouvelle classe d'acides organiques qui sont désignés depuis la suggestion de Ling [181] sous le nom « d'acides uroniques ».

Les recherches récentes d'Heidelberger, Goebel [104] et leurs collaborateurs qui ont décelé l'acide glycuronique chez certains microorganismes, ont montré toute l'importance de ce corps (en tant que glucide)

dans la spécificité microbienne et son rôle insoupçonné en immunologie.

D'autres recherches qui demandent une confirmation, le font intervenir dans certains processus importants de l'économie humaine et animale.

Enfin plusieurs auteurs allemands ont étudié avec de nouvelles techniques la question de la valeur de l'épreuve de la glycuronurie qu'ils considèrent comme un bon test de la capacité fonctionnelle du foie.

Si tous ces travaux sont loin d'avoir épuisé l'étude de cet intéressant acide, ils ont néanmoins montré que l'importance de ce corps avait été nettement sous-estimée et que l'acide glycuronique joue vraisemblablement un rôle que l'on ne soupçonnait pas il y a quelques années.

Pour l'exposé de cette étude, dont nous venons de résumer les grandes lignes, nous avons suivi le plan général suivant :

Plan du travail

PREMIERE PARTIE

PREPARATION — PROPRIETES — CONJUGUÉS GLYCURONIQUES

I. — PRÉPARATION.

- 1° *A partir de produits naturels;*
- 2° *Par synthèse chimique;*
- 3° *Par synthèse biologique. Recherches personnelles ;*
- 4° *Conclusion.*

II. — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

III. — PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

- 1° *Constitution chimique. Les acides uroniques ;*
- 2° *Propriétés liées à sa nature glucidique ;*
- 3° *Propriétés liées à sa fonction acide.*

IV. — LES CONJUGUÉS GLYCURONIQUES (GLYCURONIDES)

DEUXIEME PARTIE

LES METHODES DE RECHERCHE ET DE DOSAGE

I. — EXAMEN QUALITATIF.

II. — EXAMEN QUANTITATIF.

Exposé des méthodes:

1° *Méthode polarimétrique ;*

2° *Méthode colorimétrique ;*

3° *Méthodes chimiques ;*

4° *Conclusion.*

TROISIEME PARTIE

APPLICATIONS CLINIQUES — ETAT NATUREL METABOLISME

I. — APPLICATIONS CLINIQUES.

1° *Bases physiologiques ;*

2° *Résultats ;*

3° *Conclusions ;*

4° *Etude des lésions du foie et du rein chez les
animaux d'expériences.*

II. — ETAT NATUREL.

1° *Dans le règne végétal. Les polyuronides ;*

2° *Dans le règne animal.*

III. — MÉTABOLISME.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

PREMIÈRE PARTIE

Préparation Propriétés
Conjugués glycuroniques

Préparation

Les différentes méthodes préconisées pour la préparation de l'acide glycuronique sont nombreuses ; nous n'avons pas l'intention de les exposer toutes en détail, nous insisterons seulement sur celles qui présentent un intérêt à des titres divers. Nous voulons, dès l'abord, faire remarquer que l'on se heurte dans la préparation d'un tel corps à de grosses difficultés. Nous n'en voulons pour preuve que le grand nombre des méthodes tour à tour proposées et la date récente de l'obtention de l'acide libre à l'état cristallisé. C'est un composé extrêmement sensible à l'action des divers réactifs, acides ou alcalis, à l'influence de la chaleur à tel point qu'il est souvent nécessaire de poursuivre certaines parties de l'opération à la température de la glace fondante, et dont la purification se révèle extrêmement pénible. Il arrive souvent que les différents temps de la technique ayant donné satisfaction, on croit pouvoir réussir une bonne opération : une décarboxylation notable ou une hydrolyse brusquement trop brutale, viennent réduire le rendement à des proportions très faibles.

Un autre point que nous voudrions signaler, c'est que la plupart des méthodes que nous allons exposer donnent comme produit final la lactone et non pas

l'acide libre. Il est vrai que ces dernières années, divers procédés ont été découverts qui permettent de passer assez facilement de la lactone à l'acide. Nous insisterons davantage cependant sur les techniques permettant d'obtenir directement l'acide. Enfin nous développerons surtout la méthode que nous avons étudiée, qui a fait l'objet de recherches toutes récentes et qui, à l'heure actuelle, permet d'obtenir l'acide glycuronique et son conjugué, avec un rendement assez satisfaisant.

Nous avons divisé cette étude en trois parties : dans la première, nous rangeons les procédés de préparation qui empruntent comme matières premières des produits naturels. Dans la deuxième, nous ferons figurer les procédés qui utilisent la synthèse chimique en raison de leur intérêt théorique, et enfin nous étudierons dans une troisième partie les méthodes beaucoup plus importantes basées sur la synthèse biologique.

I. — Préparation à partir de produits naturels

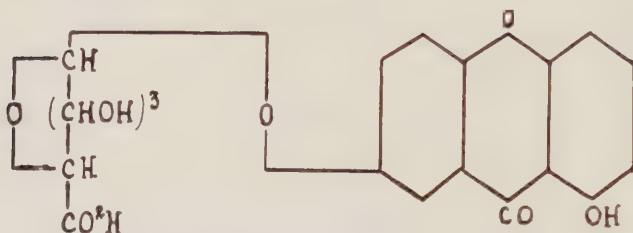
A. — ACIDE EUXANTHIQUE DU JAUNE INDIEN

Nous avons vu à propos de l'historique comment Spiegel [249], constatant les pertes considérables qui survenaient en utilisant la technique de Schmiedeberg et Meyer, chercha un composé qui put fournir de la glycurone avec un rendement supérieur. Reprenant les études de Baeyer [13] il montra que le jaune indien pouvait constituer une matière première intéressante.

Le jaune indien naturel ou « purree » est une sorte de masse à odeur urineuse, colorée en brun plus ou moins sale à l'extérieur, en jaune orangé à l'intérieur. Cette matière colorante constitue le dépôt de l'urine des vaches qui mangent des feuilles de manguier. Elle contient, à l'état de sels magnésiens et calciques, un composé acide, l'acide euxanthique qui s'y trouve dans la proportion de 9 à 34 %.

Sous l'influence des acides minéraux dilués et à chaud, cet acide euxanthique se dédouble en deux constituants : l'acide glycuronique et l'euxanthone, dérivé dihydroxylé de la xanthone ou diphénopyrone. L'analyse de l'acide euxanthique a fait l'objet d'une étude

récente de Robertson et Waters [238] qui ont élucidé sa constitution : c'est un euxanthylglycuronide qu'on peut représenter par la formule schématique suivante, l'acide glycuronique y possède la structure pyranique habituelle :



On peut donc distinguer deux phases dans cette préparation : tout d'abord l'extraction de l'acide euxanthique et ensuite l'hydrolyse de cette substance pour libérer l'acide glycuronique.

1° EXTRACTION DE L'ACIDE EUXANTHIQUE DU JAUNE INDIEN.

On utilise en général le procédé suivant dû à Graebe [77]. Le jaune indien est épuisé par de l'acide chlorhydrique dilué à 1 % à froid, et le résidu traité par une solution concentrée de carbonate d'ammoniaque qui dissout l'acide euxanthique. La solution alcaline filtrée est acidifiée par l'acide chlorhydrique à 1 % à froid et le précipité est recueilli. On dissout ce précipité dans l'alcool où l'acide euxanthique cristallise, on obtient ainsi des aiguilles jaunes fondant à 156°-158° et insolubles dans l'eau.

2° HYDROLYSE DE L'ACIDE EUXANTHIQUE.

On peut l'effectuer au moyen de l'acide sulfurique à 2 %, mais Kütz [138] ainsi que Thierfelder [274] conseillent d'opérer l'hydrolyse à l'autoclave à 120° sans addition d'acide et en présence d'une grande quantité d'eau.

Dix parties d'acide euxanthique triturées avec 100 à 200 parties d'eau, sont chauffées à l'autoclave d'abord ouvert, de façon à chasser l'oxygène atmosphérique, on ferme ensuite et on maintient la température pendant une heure à 120°-125°. On laisse refroidir, on filtre et la partie restée insoluble est soumise encore deux fois au même traitement. On sépare par filtration le dépôt d'euxanthone. Les liqueurs filtrées réunies sont évaporées à 40°, ou mieux, dans le vide, jusqu'à consistance de sirop liquide, puis abandonnées à cristallisation. On obtient ainsi des cristaux brunâtres d'anhydride glycuronique et les eaux-mères portées à l'ébullition pendant 10 minutes, puis refroidies, fournissent, lorsqu'on répète cette opération, toute une série de cristallisations d'anhydride. Une nouvelle cristallisation dans l'eau chaude, avec addition de noir, donnerait finalement l'anhydride tout à fait pur.

C'est ce procédé de préparation qui a permis à Thierfelder de faire une étude assez complète de la lactone glycuronique, d'en fixer les principales caractéristiques physiques et chimiques qui furent utilisées pendant de longues années par les chimistes s'occupant de la question. Cette méthode a été utilisée jusqu'à l'époque (1910) où Neuberg [188] publia la pré-

paration à partir de l'acide mentholglycuronique. Ce procédé d'obtention au jaune indien donnant des rendements très faibles, ne peut être utilisé pour des quantités importantes ; d'autre part, la cristallisation est souvent impossible, même entre les mains de chimistes expérimentés. En réalité, cette technique sert plutôt à obtenir des solutions d'acide glycuronique.

B. — A PARTIR DE L'AMIDON

L'amidon est utilisé ici comme matière première pour l'obtention de l'acide saccharique. C'est à partir de ce corps que Fischer et Piloty [65] ont réalisé une véritable synthèse de l'acide glycuronique par réduction de la lactone saccharique. Cette préparation d'un grand intérêt théorique a, par contre, une importance pratique des plus restreintes. Etant donné son caractère, nous pensons plus logique de l'étudier en même temps que les procédés par synthèse chimique dans le chapitre suivant.

C. — ACIDE ALDOBIONIQUE DE LA GOMME ARABIQUE

Les premières recherches chimiques sur les gommes avaient permis de ranger ces substances parmi les hydrates de carbone complexes. De nombreux travaux avaient ensuite démontré la présence de propriétés acides, sans qu'il soit possible à l'époque

d'identifier la constitution exacte du corps possédant cette réaction. Des recherches de ces dernières années ont permis d'élucider cette constitution que nous exposerons dans une autre partie de cette thèse. Qu'il nous suffise d'indiquer ici, pour la compréhension du sujet, que les constituants fondamentaux des gommes du groupe arabe, sont : l'acide *d* glycuronique et le *d* galactose. Ces deux corps sont unis par une liaison analogue à celle des biholosides réducteurs, pour former une substance que la terminologie actuelle désigne sous le nom général d'acide aldobionique, c'est ici un acide galactoglycuronique.

Sur une suggestion de F. Ehrlich, F. Weinmann [288] a essayé de préparer l'acide glycuronique pur à partir de cette substance, tentative qui fut couronnée de succès. Nous allons exposer la technique la plus récente de Weinmann [289] (1931). Cet auteur a pu, dans tous les cas, obtenir l'acide libre à l'état cristallisé. Le principe de cette préparation est le suivant : Une hydrolyse chlorhydrique modérée de la gomme libère l'acide aldobionique. L'auteur le désigne sous le nom d'acide gommique, en réalité, le pouvoir rotatoire de ce corps peut permettre de reconnaître son identité avec l'acide aldobionique isolé à l'état cristallisé de la gomme arabe par Heidelberger et Kendall [105]. Nous le désignerons sous son vrai nom d'acide aldobionique, de façon à éviter la confusion avec l'acide gommique des auteurs classiques. Cet acide est décomposé par l'acide sulfurique qui libère son constituant : l'acide glycuronique. Celui-ci est ensuite purifié soigneusement. Nous diviserons ces

opérations en quatre phases : d'abord la préparation de l'acide aldobionique, puis son hydrolyse, enfin la purification de l'acide glycuronique et sa cristallisation.

1° PRÉPARATION DE L'ACIDE ALDOBIONIQUE.

La variété de gomme qui donne le meilleur rendement est celle désignée sous le nom d' « Hachab Kordofan », c'est le principal type des gommes d'Egypte.

Deux cents grammes de cette gomme arabique (Kordofan commercial) sont dissous dans 300 cc. d'acide chlorhydrique à 2 %. Il est essentiel de procéder avec ces quantités respectives. La manière d'opérer la plus simple consiste à diviser soigneusement la gomme en menus fragments ; on laisse ensuite macérer douze heures. On termine la dissolution au bain-marie et par agitation. Lorsque celle-ci est complète, la solution est chauffée pendant environ une heure et demie, au bain-marie bouillant, en utilisant un réfrigérant à reflux. La dégradation est complète lorsque le pouvoir rotatoire n'augmente plus. En utilisant la variété indiquée qui est lévogyre et dont le pouvoir rotatoire atteint : $[\alpha]_D = -24^\circ$ à -32° , l'angle de rotation observé dans un tube de un décimètre, monte jusqu'à une limite voisine de $+19^\circ$. Le produit de la réaction est alors devenu un liquide fluide et assez limpide. Les échantillons pour l'examen polarimétrique après addition de Kieselgur donnent un filtrat absolument limpide. Lorsque la rotation n'augmente plus, on

cesse de chauffer, et on passe la masse à travers un linge, puis en utilisant un filtre, on retient ainsi diverses impuretés non dissoutes et des matières résineuses.

Le filtrat jaune clair, encore chaud, est additionné petit à petit et en agitant continuellement, de deux litres d'alcool éthylique à 96° qui précipite une masse blanchâtre et visqueuse, constituée par l'acide aldobionique impur. Après avoir laissé reposer plusieurs heures, l'alcool qui renferme la plus grande partie des pentoses contenus dans la gomme et des composés minéraux, est décanté soigneusement, et neutralisé, puis soumis à la distillation pour récupération. Cette décantation est facile, car l'acide aldobionique reste adhérent aux parois du récipient.

Cet acide est dissous au bain-marie dans 150 cc. d'eau distillée et la solution est refroidie. On utilise un récipient d'une capacité de trois litres. On effectue une nouvelle précipitation par l'addition de 1.500 centimètres cubes d'alcool. Après quelques heures, on décante. Le liquide alcoolique décanté est en général trouble et présente une apparence laiteuse par suite d'une certaine quantité d'acide resté en suspension que l'on peut récupérer de la façon suivante : on ajoute au liquide un peu de Kieselgur, on agite et on filtre au bout d'un certain temps par aspiration. La quantité recueillie est d'ailleurs minime.

La masse précipitée est de nouveau dissoute dans l'eau, et purifiée encore par précipitation alcoolique. On jette le tout sur un entonnoir de Büchner et onessore le précipité par aspiration. On le lave enfin à

l'alcool, puis à l'éther. Il se présente alors sous la forme d'une poudre blanche constituée par de l'acide aldobionique assez pur, du poids de 80 grammes environ.

2° HYDROLYSE DE L'ACIDE.

120 grammes de cette substance sont dissous dans 1.200 centimètres cubes d'acide sulfurique normal. La solution est ensuite chauffée à l'ébullition pendant quinze à dix-huit heures sous réfrigérant à reflux. Au cours de l'opération, le liquide se colore fortement et on voit apparaître un précipité bleu noir. Comme dans l'hydrolyse précédente, le cours de celle-ci est suivi par des contrôles polarimétriques. L'angle de rotation optique s'élève graduellement de $+ 0^{\circ},7$ à $+ 4^{\circ},6$ mesuré avec un tube de un décimètre. On est averti d'avoir atteint un dédoublement complet lorsque la valeur de l'angle de rotation ne varie plus en continuant l'opération. Pour ces déterminations, un échantillon du mélange est après filtration suffisamment limpide en général. Au cas où une décoloration serait nécessaire, il est important que celle-ci s'opère toujours de la même façon. Il suffit d'ajouter une faible quantité de charbon animal et de chauffer quelques instants au voisinage du point d'ébullition. Un point très important de la technique réside dans le fait que l'hydrolyse de la gomme doit être complète, car la présence de l'acide galactoglycuronique non décomposé entrave d'une façon considérable la purification et la cristallisation de l'acide glycuronique.

3° PURIFICATION DE L'ACIDE GLYCURONIQUE.

Pour purifier cet acide, on le transforme en sel de baryum, que l'on isole à l'état pur par précipitation fractionnée au moyen de l'alcool.

Le mélange brun hydrolysé est refroidi et, en agitant avec précaution, on ajoute une solution contenant 192 grammes de $\text{Ba}(\text{OH})^2, 8\text{H}^2\text{O}$, tiédie au bain-marie, et de façon à ne pas obtenir une neutralisation complète. Il est important de bien avoir soin de ne pas rendre alcaline des portions du liquide, par suite d'une agitation insuffisante. On additionne ensuite d'un peu de Kieselgur, on filtre par aspiration et on lave le précipité à l'eau bouillante. De façon à décomposer complètement la lactone, les filtrats réunis sont chauffés légèrement pendant quelques minutes avec un léger excès de carbonate de baryum bien exempt d'alcali libre. On filtre de nouveau après agitation avec du Kieselgur et du noir animal. Le filtrat est évaporé dans le vide à une température de $+ 50^\circ$ jusqu'à une quantité de 300 centimètres cubes. La purification de ce liquide d'un brun foncé s'opère par une précipitation fractionnée. Pour cela on ajoute un peu d'alcool à 95° jusqu'à apparition de flocons que l'on sépare par filtration après les avoir laissés se déposer. La solution est alors devenue sensiblement plus claire. Cette opération est répétée s'il le faut tant que le précipité ne prend pas un aspect huileux. A ce moment, on sépare le sel de baryum de l'acide glycuronique par l'addition d'une quantité suffisante d'alcool à 96° (en moyenne 2.500 centimètres cubes). Celui-ci se dé-

pose d'autant plus lentement qu'il est plus pur. En général, le corps obtenu est impur, il faut continuer la purification. A cet effet, l'alcool trouble et laiteux est séparé par décantation du dépôt de sel de baryum, il est agité avec du Kieselgur et filtré par aspiration. Le contenu de l'entonnoir-filtre qui représente le glycuronate de baryum resté en suspension dans l'alcool, est dissout dans l'eau et la solution est filtrée. On dilue ce filtrat aqueux à 250 centimètres cubes environ avec de l'eau et on utilise cette solution pour dissoudre le sel de baryum précipité. On chauffe légèrement, on refroidit et on filtre. On répète sur ce filtrat les opérations précédemment décrites de précipitation fractionnée des impuretés par addition ménagée d'alcool. Finalement, on mélange la solution avec du Kieselgur et on la filtre soigneusement. Si l'opération a réussi, on obtient en général un liquide limpide. On isole alors le glycuronate de baryum en ajoutant deux litres d'alcool à 96°. On obtient alors ce corps sous une forme assez pure. Les impuretés qui ont été partiellement séparées au cours des précipitations fractionnées par l'alcool ont entraîné avec elles des quantités considérables de glycuronate de baryum. Ces résidus, retenus sur le Büchner à chaque filtration, sont rassemblés, dissous dans l'eau et soumis aux traitements qui viennent d'être décrits pour récupérer le maximum de sel de baryum purifié.

4° CRISTALLISATION DE L'ACIDE GLYCURONIQUE.

L'isolement de l'acide libre s'opère par une méthode analogue à celle de Ehrlich et Rehorst [15],

c'est-à-dire précipitation du baryum par une quantité strictement définie d'acide sulfurique.

Le glycuronate de baryum est dissout dans l'eau froide, puis on ajoute de l'acide sulfurique dilué en quantité telle qu'une partie aliquote du liquide montre encore la présence du sel de baryum non décomposé. Cette addition d'acide se fait petit à petit et accompagnée d'une agitation soigneuse. L'opération est terminée lorsque une prise d'essai présente encore avec l'acide sulfurique une faible opalescence. Il est, en effet, indispensable d'éviter la présence de l'acide sulfurique en excès, même à l'état de traces. On filtre et on concentre le filtrat notablement ; on ajoute alors environ la dixième partie du volume d'alcool à 96°. On laisse reposer pendant quelques heures et on filtre. Le glycuronate de baryum non décomposé est ainsi éliminé. On concentre ensuite le filtrat dans le vide à la température de 30°. Finalement on évapore dans une capsule jusqu'à obtention d'un sirop épais. La cristallisation spontanée commence déjà. Le mélange est agité au moyen d'une baguette de verre et, après un ou deux jours, il se prend en masse. Cette masse est alors broyée avec de l'alcool à 85°, puis laissée en repos quelques heures, on ajoute ensuite de l'alcool à 90°, puis à 96°, de façon à délayer le mélange. Ces opérations ont pour but de ramollir et de dissoudre les impuretés sirupeuses comme l'acide galactoglycuronique et la lactone qui a pu se former, en mettant à profit la plus grande solubilité de cette dernière dans l'alcool éthylique. La bouillie cristalline claire est ensuite filtrée par aspiration, lavée avec de l'alcool à 90°,

puis avec de l'alcool à 96°, et broyée encore une fois avec de l'alcool à 90°. On filtre sur un Büchner et on lave soigneusement les cristaux avec de l'alcool, puis avec de l'éther. La lactone est ainsi éliminée. On dessèche finalement dans le vide sulfurique.

L'acide glycuronique ainsi obtenu est déjà sensiblement pur ; pour l'avoir complètement purifié, on le soumet à une recristallisation dans l'alcool à 90°. Il présente alors des constantes physiques correctes bien définies par Ehrlich et Rehorst [60].

La quantité obtenue à l'état cristallisé représente les deux tiers de la totalité. Le reste peut être obtenu à partir des eaux-mères, mais sous forme de lactone. Il est à remarquer que dans les opérations défectueuses on obtient uniquement la lactone et il faut attendre très longtemps pour avoir une cristallisation complète. En effet, contrairement à l'acide libre qui cristallise très vite dans ses solutions concentrées, la glycurone se sépare lentement et par étape.

Pour diminuer le prix de revient de cette préparation, on peut remplacer sans inconvénient l'alcool éthylique pur par de l'alcool dénaturé par l'éther de pétrole.

Pour arriver à un résultat satisfaisant, il est nécessaire d'observer un *certain nombre de précautions* :

1° Il est essentiel, par exemple, de ne pas dépasser la température indiquée pendant la concentration des solutions aqueuses d'acide glycuronique. Sous l'influence d'une chaleur trop forte, il y a formation de lactone, particulièrement rapide en présence de certai-

nes impuretés. Une erreur à ce stade est facilement découverte en faisant un titrage alcalimétrique dans les conditions que nous verrons plus loin. Il est préférable alors, si l'on reconnaît la présence notable de lactone, de transformer tout l'acide en glycurone par élévation de la température. On forme le sel de baryum et on recommence les opérations de libération de l'acide libre.

2° L'opération ne se poursuit bien que si l'on peut obtenir du glycuronate de baryum suffisamment pur. Il est donc nécessaire de vérifier la pureté du sel de baryum obtenu. Le sel pur présente un pouvoir rotatoire spécifique de $[\alpha]_D^{20,5} = + 17^{\circ},45$. On peut cependant continuer l'opération si l'on obtient des valeurs de pouvoir rotatoire ne dépassant pas une diminution de plus de 20 %. Cette diminution de la rotation spécifique est due soit à une hydrolyse incomplète provenant d'un mauvais contrôle polarimétrique, soit à une précipitation fractionnée insuffisante des impuretés.

3° Il ne faut employer dans la technique que du Kieselgur purifié. Il est nécessaire d'effectuer cette purification par lavage à l'alcool chaud.

La préparation que nous venons d'indiquer s'effectue à partir de la gomme arabique du Kordofan, Weinmann [289] a étendu ses recherches à d'autres variétés. Il a montré, en particulier, que la gomme arabique de Gesireh, deuxième variété importante des gommes d'Egypte, peut donner également de l'acide gly-

curonique, mais l'hydrolyse en est beaucoup plus difficile, aussi n'est-elle pas indiquée pour la préparation de cet acide. Il a également étudié le groupe des gommés Nostras, ou gommés des Rosacées, et a pu préparer de l'acide glycuronique à partir d'une gomme du cerisier.

Nous avons pensé, au début de nos essais, utiliser cette méthode de préparation ; mais des recherches préliminaires nous ont montré que cette technique n'était pas encore définitivement au point. La détermination de l'origine botanique exacte de la gomme utilisée est importante pour avoir de bons résultats. Les variétés autres que celles du Kordofan donnent des résultats beaucoup plus inconstants. D'autre part, le rendement qui serait de 10 grammes d'après l'auteur avec les quantités indiquées, peut être bien plus faible. Enfin les différents temps de la technique sont sujets à trop de contingences pour permettre une opération rapide et pratique. Nous reconnaissons cependant que cette méthode constitue un progrès très considérable dans la préparation de l'acide glycuronique. Elle utilise une matière première très commune et, bien qu'elle demande à être améliorée, elle constituera vraisemblablement dans l'avenir une méthode susceptible de fournir l'acide glycuronique en quantité notable.

II. — Préparation par synthèse chimique

Nous allons étudier dans ce chapitre les procédés de préparation par synthèse chimique non pas tant en raison de leur intérêt pratique, mais parce qu'ils ont permis de démontrer la constitution chimique de l'acide glycuronique et la relation des glycuronides (conjugués glycuroniques) avec les glucosides.

A. — REDUCTION DE LA LACTONE SACCHARIQUE

Les lactones de certains acides dérivés des sucres, ainsi que Kiliani [135] l'a reconnu pour la première fois pour la dilactone *l* mannosaccharique, se laissent réduire par l'hydrogène naissant de l'amalgame de sodium; elles peuvent fournir ainsi successivement, soit un aldose et un alcool polyatomique (lactones aldoniques), soit un acide aldéhyde (acide uronique) et un acide aldonique (lactones sacchariques et muciques).

Fischer [66] a étendu et complété ces premières recherches. Il a montré que les acides dérivés des sucres sont, à l'état normal, absolument irréductibles par l'hydrogène naissant; la réaction indiquée plus haut ne s'accomplit qu'avec leurs lactones, ou certains de

leurs éthers; aussi convient-il, pour avoir un résultat, d'effectuer la réduction en liqueur acide, de manière à éviter toute influence secondaire de la soude, qui ne manquerait pas de transformer la lactone en sel de sodium irréductible.

Dans le cas qui nous occupe, il faut opérer de la façon suivante (Fischer et Piloty) [65].

On prépare l'acide saccharique par oxydation de l'amidon au moyen de l'acide nitrique suivant le procédé de Sohst et Tollens [252 et 162]. Pour cela on délaye 100 grammes d'amidon dans 100 cc. d'eau, on verse la bouillie dans 500 cc. d'acide azotique étendu ($D=1,15$) et on chauffe sur le bain-marie jusqu'à ce qu'il commence à se dégager des vapeurs rutilantes. On abaisse la température jusque vers 70° et on évapore doucement pour chasser la plus grande partie de l'acide azotique en excès; le sirop brunâtre est ensuite étendu d'eau, neutralisé à chaud par le carbonate de potassium et enfin sursaturé d'acide acétique. Par refoedissement, il se dépose 18 à 20 grammes de saccharate monopotassique que l'on recueille et que l'on purifie par une seconde cristallisation dans l'eau chaude.

Après isolement de cet acide à l'état de sel acide de potassium, on le transforme en sel de cadmium. On traite le saccharate de cadmium ainsi obtenu par l'hydrogène sulfuré, on concentre l'acide saccharique mis en liberté et on chauffe le sirop pendant cinq à six heures au bain-marie, de manière à transformer une grande quantité d'acide en lactone. On dissout 20 grammes de ce produit dans 150 grammes d'eau, et

au liquide fortement refroidi dans la glace, on ajoute 3 cc. d'acide sulfurique à 20 % et 100 grammes d'amalgame de sodium à 2,5 %. On agite constamment en ayant soin de maintenir le mélange acide par addition d'acide sulfurique. On ajoute encore 100 grammes d'amalgame, puis 50 grammes et on obtient finalement un liquide qui réduit fortement la liqueur de Fehling. On le neutralise exactement par la soude, on concentre au bain-marie, on ajoute 10 grammes d'acide sulfurique, étendu de 20 grammes d'eau, et on verse le tout dans 8 fois son volume d'alcool absolu chaud. La liqueur filtrée, débarrassée d'alcool, est neutralisée par la baryte, puis la baryte est précipitée par l'acide sulfurique ; la liqueur filtrée et concentrée est neutralisée à chaud par le carbonate de plomb, afin d'éliminer l'acide saccharique qui peut rester en solution. Puis on précipite exactement le plomb par l'acide sulfurique; le liquide évaporé à consistance sirupeuse, laisse déposer des cristaux de lactone glycuronique, qu'on purifie par cristallisation dans l'eau chaude.

Cette méthode présente un grand intérêt théorique parce qu'elle réalise une véritable synthèse de l'acide glycuronique. De plus, par action de l'amalgame de sodium sur l'acide uronique formé, Fischer et Piloty ont réussi à obtenir des composés isomères de celui d'où l'on était parti, l'acide gulonique puis le gulose. Nous verrons plus loin l'importance de ces faits pour la constitution chimique et la formule développée de l'acide glycuronique.

Nous avons tenu aussi à résumer cette technique ici parce qu'elle a été utilisée par Kiliani [136] et que

récemment A. Meyer et J. Jeannin [163] l'ont employée pour l'obtention de solutions d'acide glycuronique. Elle ne fournit guère en pratique que des solutions de ce corps. Le rendement en produit cristallisé est en effet extrêmement faible. Les auteurs allemands eux-mêmes concluent que cette méthode longue et difficile ne saurait être employée comme mode de préparation de l'acide glycuronique.

B. — OXYDATION DES OSES (GLUCOSE)

La formule de l'acide glycuronique par ses relations avec celle du glucose, permet de prévoir que l'on peut passer de l'un à l'autre par oxydation. On sait, en effet, que cet hexose peut fournir par cette opération, suivant les conditions d'expérience, plusieurs acides : par oxydation ménagée (action de l'iode en solution alcaline) on obtient l'acide gluconique $C^6H^{12}O^7$, composé monoacide et pentaalcoolique; une oxydation énergique (acide nitrique à chaud) conduit, nous venons de le voir, à l'acide saccharique $C^6H^{10}O^8$, dérivé diacide et tétraalcoolique, en passant selon toute vraisemblance par l'acide glycuronique : $C^6H^{10}O^7$. On pouvait donc penser que le choix des oxydants permettrait peut-être de s'arrêter au stade acide glycuronique. C'est précisément ce qu'ont vérifié Jolles d'une part et Kiliani d'autre part, en utilisant, le premier l'action oxydante de l'eau oxygénée en milieu neutre à la température de 37° , le deuxième l'action de l'acide nitrique mais à la température ordinaire.

1° OXYDATION PAR L'EAU OXYGÉNÉE [128-129].

On opère dans les conditions suivantes :

On prépare quinze litres d'une solution aqueuse de glucose pur à 2 %, on la répartit en flacons de cinq litres. On traite ensuite chacun d'eux par 100 cc. d'eau oxygénée à 12 volumes. On porte le tout à 37°, température que l'on maintient pendant 144 heures, en renouvelant l'addition d'eau oxygénée toutes les vingt-quatre heures. La solution est finalement neutralisée. On décompose l'excès d'eau oxygénée par le noir de platine, et on fait disparaître l'excès de glucose non transformé par fermentation avec de la levure. On filtre alors le liquide et on le concentre dans le vide. On ajoute au résidu de la concentration une solution aqueuse de gaz ammoniac, de façon à alcaliniser largement, puis une solution concentrée d'acétate neutre de plomb. Le sel de plomb obtenu est lavé avec de l'eau à 70°-80°, puis décomposé par l'hydrogène sulfuré. Le liquide filtré est alors concentré dans le vide à la température de 40° jusqu'au volume de 30 cc.

Une variante du procédé consiste à traiter le liquide obtenu après oxydation et fermentation par l'acétate et le sous-acétate de plomb jusqu'à cessation de précipité. Le sel de plomb est lavé cinq fois par décantation, le précipité étant laissé en repos chaque fois pendant deux à quatre jours. Le sel purifié est finalement décomposé comme plus haut.

Ce procédé a l'avantage d'utiliser comme matière première le glucose, les réactifs sont peu nombreux et la purification assez aisée, si l'on part d'un glucose pur.

Il permet, d'après Jolles, d'obtenir assez facilement des solutions d'acide glycuronique. Mais le rendement est faible.

2° OXYDATION PAR L'ACIDE NITRIQUE.

Kiliani [137] cherche à obtenir avec cet agent d'oxydation les acides polyhydroxylés dérivés des sucres. Pour l'acide glycuronique il opère ainsi : 100 grammes de glucose pur sont dissous, dans un large flacon conique, dans 600 cc. d'eau froide, on ajoute 0,8 volume d'acide nitrique ($D=1,2$). Au bout de vingt-quatre heures on peut constater une réaction nette. Celle-ci devient plus lente après le huitième jour. On laisse le mélange à la température du laboratoire jusqu'au quatorzième jour. A ce moment la solution est concentrée à 250 cc., et traitée à froid par du carbonate de chaux ajouté par petites quantités à intervalles assez longs, jusqu'à neutralisation. On obtient ainsi du glycuronate de calcium. On purifie ce corps par l'élimination d'une faible quantité de carbonate de chaux non combiné. Pour cela on le laisse en contact pendant 2 à 5 heures avec cinq volumes d'acide acétique à 10 %. Le sel de calcium de l'acide glycuronique se sépare alors sous forme de cristaux durs, bien formés, contenant deux molécules d'eau de cristallisation. Les liqueurs mères, après traitement par plusieurs volumes d'alcool, donnent un précipité qui, débarrassé du nitrate de calcium et du sucre non attaqué, par lavage à l'alcool, donne par combinaison avec la soude un sel de sodium.

Il est à remarquer que l'acide glycuronique lui-même est stable vis-à-vis de l'acide azotique ($D=1,2$), à la température du laboratoire, car le sel de calcium contient seulement des quantités très minimes de saccharate de calcium.

Les sels de calcium ou de sodium obtenus traités par un acide libèrent l'acide glycuronique qui passe en solution.

Cette méthode donnerait des résultats analogues à celle de Jolles, mais elle est plus longue.

C. — OXYDATION DES HETEROSIDES

Nous venons de voir que dans certaines conditions on peut obtenir l'acide glycuronique par oxydation directe du glucose. Cependant, si l'on ne prend pas les précautions indiquées on obtient l'acide gluconique, puis l'acide saccharique. La fonction aldéhydrique du glucose étant donc la première attaquée, un certain nombre d'auteurs se sont demandés s'il ne serait pas possible de protéger celle-ci par blocage sous forme d'une liaison glucosidique par exemple, et d'oxyder ensuite la fonction alcoolique primaire de ce glucoside pour obtenir un acide glycuronique conjugué. Cet oxydation pourrait ainsi se réaliser au moyen de réactifs plus énergiques et serait beaucoup plus rapide. De plus, l'organisme animal semble procéder dans la synthèse des conjugués glycuroniques par un processus analogue, si l'on admet l'hypothèse de Fischer et de Piloty. Pouvait-on réaliser cette synthèse par voie

chimique β C'est ce que l'expérience a prouvé, démontrant ainsi la possibilité du mécanisme invoqué par Fischer.

1° MÉTHODE DE BERGMANN ET WOLFF [15].

Ces auteurs emploient comme source de glucoside, l' α menthol-glucoside qu'ils oxydent au moyen d'une solution alcaline de brôme pour obtenir l'acide correspondant.

12 grammes de menthol-glucoside sont dissous dans 150 cc. de pyridine, on ajoute en une fois à la température du laboratoire 12 grammes de brôme dans 240 cc. de soude normale. On laisse reposer vingt-quatre heures. Au bout de ce temps la réaction à l'iodure d'amidon a généralement disparu. Quand cette réaction est négative on filtre et on concentre la solution dans le vide jusqu'à réduction à la moitié de son volume primitif. On la soumet alors à l'extraction par l'éther pendant plusieurs heures. La majeure partie de l'acide reste en solution, on observe cependant quelques cristaux d' α mentholglycuronate de sodium. On acidifie alors la solution au moyen de l'acide sulfurique dilué en présence de rouge congo, et on extrait entièrement l'acide libéré par l'éther. Le conjugué passe en solution et après évaporation du solvant on obtient une cristallisation d'acide α mentholglycuronique sous forme de micropismes contenant 0,5 molécule d'eau. Le rendement serait de 0 gr. 90.

On pourrait obtenir par un processus analogue l'acide β mentholglycuronique. Pour préparer des so-

lutions d'acide glycuronique on chauffe pendant deux heures et demie à trois heures l'acide β mentholglycuronique avec dix fois son poids d'acide chlorhydrique demi-normal. L'hydrolyse s'effectue. On élimine alors le menthol avec de l'éther, l'acide minéral est neutralisé par de l'acétate de sodium. La solution traitée par une base en solution étherée ou dans l'éther acétique fournit le sel correspondant. Les auteurs ont préparé les sels de sodium, d'argent, de baryum, de cadmium et de plomb de l'acide glycuronique.

Il est important d'opérer avec l' α menthol *d* glucoside, car un essai effectué avec l' α méthylglucoside a donné aux auteurs de l'acide glyoxylique. Niemann et Link [183] sont arrivés au même résultat.

Cette technique est intéressante parce qu'elle a permis de préparer pour la première fois un α uronide (conjugué glycuronique α) qui est caractérisé par une forte déviation dextrogyre, alors que tous les uronides naturels sont des isomères β et sont lévogyres.

D'après Ohle [208], la méthode de Bergmann et Wolff est mauvaise, le rendement est très faible.

2° MÉTHODES DIVERSES.

En variant les agents d'oxydation et en utilisant des réactifs moins violents que le brôme, certains auteurs sont arrivés à obtenir par oxydation de l' α méthylglucoside, l' α méthylglycuronide correspondant.

C'est ainsi que Smolenski [253], en utilisant l'eau oxygénée avec des traces d'oxyde de fer, a obtenu la formation de méthylglycuronide qu'il a pu isoler sous

forme de sel de brucine. Cet auteur prétend l'avoir préparé avec un rendement de 30 % ! alors qu'il a été impossible à S. Morell [164] de répéter ces expériences.

Cependant, Chiray [43] et Caille [44], en employant le permanganate, sont arrivés à obtenir des solutions d'acide méthylglycuronique pur par l'oxydation des glucosides comme les méthylglucosides α et β , l'amygdaline, la salicine, la coniférine.

Une solution contenant 10 grammes de méthylglucoside α par litre est oxydée à froid par 500 cc. d'une solution contenant 5 % de permanganate de potassium et 0 gr. 50 % de potasse. La solution permanganique est ajoutée goutte à goutte en agitant vigoureusement et en quantité théoriquement suffisante pour réaliser une oxydation complète. On laisse en contact une journée, et après ce temps on filtre. Le liquide qui passe est incolore et contient l'acide glycuronique conjugué.

Ces diverses méthodes, utilisant l'oxydation des hétérosides, présentent une certaine importance, parce qu'elles permettent de démontrer les relations de constitution qui unissent, comme nous le verrons, les glucosides et les glycuronides. Elles permettent d'obtenir assez facilement des solutions d'acide glycuronique, mais leur intérêt pratique est assez restreint en comparaison de celui des méthodes par synthèse biologique que nous allons maintenant aborder.

III. — Préparations par synthèse biologique Recherches personnelles

Nous avons vu que l'histoire de l'acide glycuronique avait débuté par l'étude des conjugués éliminés dans les urines des animaux après ingestion de diverses substances. Nous avons rappelé que c'est dans le dédoublement des acides camphoglycuroniques que Schmiedeberg et Meyer découvrirent cet acide uronique. Mais ce n'est qu'assez tardivement que l'on songea avec Neuberg à utiliser cette capacité synthétique de l'organisme pour la préparation pratique de ce corps. Nous verrons que cette méthode s'est révélée très heureuse, puisqu'elle a permis la préparation de l'acide libre à l'état cristallisé et son obtention en quantité notable, elle présente encore l'intérêt de permettre à la fois la préparation du conjugué et celle de l'acide. Nous avons étudié deux corps glycuronoformateurs appartenant à la série hydroaromatique, le menthol et surtout le bornéol.

A. — AU MOYEN DU CAMPHRE

Ce procédé a été étudié dans les travaux récents de Ishidate [126]. L'isolement des acides camphoglycuro-

niques et leur caractérisation ont été effectués par leur transformation en sels de strychnine cristallisés. Mais on s'est surtout attaché à déterminer la nature exacte de la copule aglycone de l'uronide. Il est maintenant établi que le camphérol, également appelé oxycamphre, est un mélange de 3 — oxycamphre (2 — oxycamphre) et de 5 — oxycamphre.

B. — AU MOYEN DU MENTHOL

En 1910, Neuberg et Lachmann [188] proposèrent une nouvelle méthode de préparation de l'acide glycuronique par hydrolyse de son conjugué mentholglycuronique, obtenu lui-même par extraction au moyen de l'alcool-éther, de l'urine de lapin auquel on avait fait ingérer du menthol.

Le menthol est administré en dissolvant 2 grammes dans 1 cc. d'alcool éthylique et en mettant cette solution en suspension dans 20 cc. d'eau chaude. L'acide conjugué est obtenu de l'urine en acidifiant cette dernière par l'acide sulfurique et en l'épuisant par un quart de son volume d'éther et un huitième de son volume d'alcool. L'extrait éthéré est rendu alcalin par l'ammoniaque et concentré. Le sel d'ammonium de l'acide mentholglycuronique cristallise soit spontanément, soit par addition d'ammoniaque concentrée. Le corps peut aussi être obtenu à l'état de sel de plomb par précipitation avec le sous-acétate de plomb, on le décompose ensuite par l'hydrogène sulfuré. L'acide libre est ensuite obtenu à partir du conjugué en hydro-

lisant ce dernier avec l'acide sulfurique dilué, le menthol étant extrait par l'éther de la solution hydrolytique.

Ce procédé a l'avantage par son extraction éthéro-alcoolique d'éliminer une série d'impuretés et de permettre ainsi l'obtention de corps plus facilement purifiables; mais c'est au détriment du rendement. Aussi avons-nous préféré nous adresser à la méthode de Bang [19], légèrement modifiée, méthode également utilisée par Quick [220].

Le principe consiste à précipiter l'acide mentholglycuronique sous forme de son sel ammoniacal insoluble dans l'eau froide par demi-saturation de l'urine par du sulfate d'ammoniaque.

Deux grammes de menthol sont dissous dans 1 cc. d'alcool, on ajoute 20 à 25 cc. d'eau tiède et l'on agite vigoureusement de façon à obtenir une bonne émulsion. Cette solution tiède est immédiatement administrée et quotidiennement à chaque lapin au moyen d'une sonde gastrique. On récolte l'urine des vingt-quatre heures sur fluorure de sodium. On filtre et on alcalinise par quelques gouttes d'ammoniaque concentrée. On peut mélanger alors l'urine avec son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium cristallisé, mais il est préférable de porter à l'ébullition et de faire dissoudre une quantité déterminée de sel d'ammonium, de façon à réaliser une demi-saturation du liquide. On filtre chaud et on laisse reposer à la glacière pendant douze heures. Le mentholglycuronate d'ammoniaque se dépose. On obtient un produit légèrement coloré en jaune qu'on recueille sur un filtre et

qu'on redissout dans l'eau chaude. La recristallisation à la glacière donne généralement un produit blanc qu'on dessèche à l'étuve à + 37. L'acide libre est ensuite préparé en dissolvant ce sel d'ammonium dans le minimum d'eau chaude et en ajoutant la quantité calculée d'acide chlorhydrique normal. On refroidit rapidement sous courant d'eau de façon à éviter une hydrolyse plus complète et on porte à la glacière, l'acide cristallise; une recristallisation permet de l'obtenir blanc. Ce corps contient une quantité d'eau de cristallisation variable. Fromm et Clemens [67] trouvent 1,5 molécule, tandis que Quick [220] trouve un résultat variant de 1,5 à 2 molécules d'eau. Desséché dans le vide à 100°, il devient anhydre.

Cette méthode a donné des résultats assez bons pour la préparation du conjugué, cependant, bien que possédant de réels avantages, elle ne permet pas d'obtenir de grande quantité de produit.

En effet, l'urine de lapin, bien que nous l'ayons conservée sur fluorure de sodium, fermente avec une grande facilité, d'où perte de produit ; d'autre part, l'insolubilité du sel d'ammonium n'est pas absolue et surtout il est difficile de débarrasser complètement l'acide libre du chlorhydrate d'ammoniaque formé sans grande perte. Notons aussi que, jusqu'à la découverte de Ehrlich et Rehorst, ces méthodes ne permettaient pas d'obtenir l'acide libre, mais tout au plus une faible quantité de lactone glycuronique. Aussi avons-nous abandonné cette méthode comme donnant un rendement insuffisant.

Certains auteurs ont étudié ces techniques, Jacob-

sohn et A. da Cruz [130] n'ont pas pu préparer de produits cristallisés, ni par la méthode de Bang, ni par celle de Neuberg et Lachmann. Ils ont modifié la méthode générale et ont réussi par ce moyen à obtenir un conjugué pur. Voici leur procédé :

On administre à un chien de 5 kilos, par ingestion, une émulsion de cinq grammes de menthol par jour, pendant une semaine. L'urine est recueillie en totalité et déféquée à l'aide d'une solution concentrée d'acétate de plomb neutre. Après filtration on ajoute au liquide une solution de sous-acétate de plomb en ayant soin d'éviter un excès de réactif. On sépare ainsi le sel de plomb de l'acide menthol glycuronique qui précipite. On recueille ce précipité sur un Büchner, et on le traite en suspension dans l'eau par l'hydrogène sulfuré. Le liquide est libéré du sulfure de plomb par une nouvelle filtration, et l'acide sulfurique en excès est éliminé par un courant d'air. On neutralise par l'hydrate de baryum, et on procède à la concentration de la solution au bain-marie. Le baryum est précipité dans le liquide obtenu par l'acide sulfurique ajouté en quantité strictement nécessaire. On sépare le sulfate de baryum par filtration et on obtient une solution d'acide mentholglycuronique. Ce liquide a été évaporé à 35° dans le vide, sans donner de cristallisation. Le résidu sirupeux a été alors neutralisé par l'ammoniaque, ce procédé n'a pas donné lieu encore à la formation de cristaux. Les auteurs ont alors employé l'éther pour l'extraction du glycuronide. La cristallisation n'ayant pas été obtenue par évaporation de la solution éthérée, ils ont neutralisé le résidu par une

solution concentrée d'ammoniaque. Des cristaux de glycuronate se sont enfin formés. Ils ont été dissous avec de l'acide sulfurique dilué employé à une légère chaleur. L'acide menthol glycuronique devenu libre a cristallisé par refroidissement.

F. Schmid [254] a également légèrement modifié le procédé de préparation de Neuberg et Lachmann de la façon suivante :

Un lapin reçoit en l'espace de cinq jours 10 grammes de menthol. Les urines recueillies (1.800 cc.) sont réduites au bain-marie jusqu'à environ 200 cc. et acidifiées par l'acide sulfurique jusqu'à réaction acide au rouge congo, puis extraites par l'alcool éther dans un appareil à extraction continue. L'extrait éthéré est alcalinisé par addition d'ammoniaque; après évaporation de l'éther, il cristallise dans le résidu une masse jaunâtre qui est séparée par filtration et dissoute dans un peu d'eau bouillante. On décolore par une très faible quantité de charbon, on filtre à chaud et on laisse cristalliser ce qui est terminé au bout de 24 heures. Ces cristaux sont constitués par du menthol glycuronate d'ammoniaque. Pour mettre l'acide en liberté on les dissous dans quelques centimètres cubes d'eau bouillante acidifiée par environ 1 % d'acide sulfurique. On refroidit rapidement sous courant d'eau et on laisse cristalliser à la glacière. Cette seconde cristallisation permet d'avoir de l'acide menthol glycuronique pur.

Nous nous sommes peut-être trop étendu sur ces diverses techniques, qui ne sont en somme que des variantes les unes des autres. Mais c'est pour faire ressortir les difficultés rencontrées dans l'obtention de ces substances.

Leur principal inconvénient réside, nous l'avons déjà dit, dans leur faible rendement. Schmid arrive à un pourcentage de 13,1 % par rapport à la quantité théorique du glycuronide susceptible de se former. Cependant l'obtention de ce mentholglycuronide est intéressante parce que c'est à partir de ce conjugué que fut préparé l'acide glycuronique libre à l'état cristallisé par Ehrlich et Rehorst.

Préparation de l'acide glycuronique cristallisé (59-60) à partir du mentholglycuronide (Ehrlich et Rehorst) (1925-1929).

Ces deux auteurs ont essayé d'appliquer à la préparation de l'acide glycuronique, le procédé qu'ils avaient utilisé pour l'isolement d'un de ses isomères, l'acide galacturonique, des matières pectiques. Ils ont montré qu'en procédant au dédoublement hydrolytique des conjugués sous l'influence des acides minéraux dilués, on obtenait d'abord la libération de l'acide glycuronique libre, mais que, après élimination de l'acide minéral, ce corps se transformait en solution aqueuse et à une température relativement peu élevée, en anhydride interne ou lactone qui cristallisait lentement. Ils ont ensuite établi qu'il était possible d'empêcher la formation de cette lactone et d'obtenir un corps rigoureusement pur en remplissant les conditions suivantes : Il faut opérer le dédoublement, non sous pression, et à température élevée, mais à celle du bain-marie. Il vaut mieux utiliser l'acide sulfurique de pré-

férence à l'acide chlorhydrique, en raison de la stabilité curieuse présentée par l'acide glycuronique vis-à-vis de l'acide sulfurique. *On neutralise ce dernier corps par l'hydrate de baryum en excès, non seulement pour éliminer toute trace d'acide sulfurique, mais pour purifier l'acide glycuronique par passage sous forme de sel de baryum.* C'est de ce dernier corps qu'on libère finalement l'acide uronique, par une quantité légèrement plus faible que la quantité calculée et à basse température en présence d'alcool. La cristallisation s'effectue très rapidement, enfin on purifie soigneusement les cristaux par lavage à l'alcool fort qui élimine les traces de lactone qui aurait pu se former. Kiliani [141] ne s'est pas tenu rigoureusement à ces conditions et a obtenu la lactone.

Dans leur premier procédé de préparation, Ehrlich et Rehorst [59] libéraient l'acide mentholglycuronique de son sel d'ammonium en dissolvant celui-ci dans l'alcool bouillant et en additionnant cette solution d'acide sulfurique. Le sulfate d'ammoniaque, peu soluble, précipitait. Mais des difficultés dans la purification résultaient quelquefois du fait que du sulfate d'ammoniaque se dissolvait rapidement dans la solution alcoolique acide de menthol glycuronide, et il était très difficile de s'en débarrasser dans la suite des opérations, aussi les auteurs ont-ils été amenés à modifier leur méthode primitive [60].

On met en suspension dans 400 cc. d'eau distillée 41 gr. 90 de menthol glycuronate d'ammoniaque soigneusement purifié. On ajoute 10 gr. 40 d'acide sulfurique pur concentré que l'on a préalablement délayé

avec une faible quantité d'eau distillée. On agite de façon à obtenir une solution limpide ; on soumet ce liquide à l'extraction au moyen de l'éther dans un appareil à extraction continue, pendant vingt-quatre heures. Le menthol glycuronide libéré passe dans l'éther. Pour éliminer complètement le sulfate d'ammoniaque qui aurait pu se dissoudre dans la solution éthérée, celle-ci est agitée à deux reprises avec de l'eau. Ce temps est suffisant, car la dernière eau de lavage ne contient plus trace de sulfate. On évapore alors cette solution éthérée, l'acide mentholglycuronique se sépare en cristallisant au moment de l'évaporation. On le dissout dans un peu d'eau chaude et on verse cette solution dans une capsule de porcelaine contenant un mélange de 20 gr. 50 d'acide sulfurique pur concentré et d'un litre d'eau. On chauffe le tout pendant douze heures au bain-marie bouillant en remuant de temps en temps. On abandonne alors au refroidissement, la majeure partie du menthol libéré pendant le dédoublement se sépare sous une forme solide. On filtre et on concentre la solution sous une cloche à vide jusqu'à environ 500 cc. Pendant cette concentration le reste du menthol se volatilise. On élimine alors une faible quantité de menthol glycuronide non décomposé et diverses impuretés colorées. Pour cela on extrait la solution continuellement pendant douze heures au moyen de l'éther. On ajoute alors à ce liquide aqueux et acide une solution dans l'eau distillée contenant 67 grammes d'hydrate de baryum préalablement chauffée. L'acide sulfurique en excès précipite sous forme de sulfate de baryum et une partie de l'acide

glycuronique est transformée en sel de baryum soluble dans l'eau. Le sulfate de baryum est éliminé par filtration sur un Büchner et bien lavé avec de l'eau chaude. Les filtrats sont réunis et neutralisés complètement au moyen de 12 grammes de carbonate de baryum. Cette neutralisation s'opère au bain-marie à une douce chaleur. La solution obtenue en définitive est séparée du carbonate de baryum en excès, décolorée par du noir animal et concentrée dans le vide à 100 cc. environ. On procède alors à la mise en liberté de l'acide glycuronique à partir de son sel de baryum.

Pour cela on additionne le résidu de la concentration, à la température du laboratoire, de 95 cc. d'acide sulfurique normal. On opère soigneusement le mélange, le sulfate de baryum précipite. On ajoute alors 1.100 cc. d'alcool éthylique à 96° qui insolubilise le glycuronate de baryum non décomposé. On filtre et on évapore le filtrat alcoolique dans le vide à une température voisine de + 30°, jusqu'à environ 50 cc. On pousse la concentration d'abord sur chlorure de calcium, puis sur acide sulfurique, de façon à obtenir un sirop épais. La cristallisation spontanée se produit alors et en peu de temps on obtient une masse cristalline. On broie totalement ces cristaux avec de l'alcool à 96° et on les essore soigneusement à la trompe, on les lave encore avec de l'alcool, puis de l'éther, enfin on les dessèche dans le vide sulfurique. Ehrlich et Rehorst ont ainsi obtenu de l'acide glycuronique rigoureusement pur et exempt de lactone, sous forme de fines aiguilles incolores.

C'est par ce procédé que les deux chimistes alle-

mands ont réussi à obtenir pour la première fois l'acide libre à l'état cristallisé. Le principe de leur méthode a été ensuite généralement suivi par les chercheurs, nous l'avons vu appliqué dans la technique de Weinmann. Mais on s'est surtout occupé de se procurer une matière première, qui pût être obtenue en plus grande abondance que le menthol glycuronide. Les méthodes récentes se sont adressées au glycuronide obtenu avec le bornéol que nous avons pu préparer après Quick, qui, le premier, a attiré l'attention sur ce procédé. Nous verrons que c'est de cette façon qu'on peut, à l'heure actuelle, obtenir l'acide glycuronique ou son conjugué en quantité notable.

C. — AU MOYEN DU BORNEOL

Les diverses préparations que nous avons passées en revue jusqu'à maintenant ne donnent pas entière satisfaction. Ou bien elles sont d'une technique trop délicate qui ne donne pas toujours le produit désiré. ou elles fournissent des rendements vraiment insuffisants. Or, pour être capable d'étudier le métabolisme de l'acide glycuronique et de ses conjugués, il est nécessaire de pouvoir se procurer des quantités importantes de ces corps à l'état pur. Par conséquent la première étape de ces recherches doit être l'étude d'une méthode pratique d'obtention.

Les problèmes qu'il s'agit donc de résoudre dans ces préparations par synthèse biologique sont les suivants : 1° Obtention régulière d'un conjugué glycu-

ronique fourni avec un rendement satisfaisant; 2° Isolement de cet uronide à l'état pur d'une façon aussi intégrale que possible et avec le concours d'un minimum de réactifs; 3° Hydrolyse du conjugué, isolement et cristallisation de l'acide.

Un auteur américain, A.-J. Quick [221] a particulièrement étudié ces questions et a proposé en 1927 une méthode de préparation à partir de l'acide bornéolglycuronique dont voici le principe :

On fait ingérer à des chiens d'assez grandes quantités de bornéol, on isole de l'urine le bornéol glycuronide formé par obtention en milieu acide de son sel de zinc insoluble dans le liquide réactionnel. On décompose ensuite ce sel dans certaines conditions par l'acide sulfurique pour mettre en liberté le glycuronide. Enfin, on hydrolyse ce dernier à l'ébullition par l'acide sulfurique dilué, on neutralise exactement l'acide en excès et on concentre la solution obtenue après élimination du bornéol jusqu'à cristallisation. On obtient un mélange d'acide et de lactone que l'on purifie en utilisant la solubilité de la glycurone dans l'alcool pour avoir finalement l'acide pur.

Pour plus de clarté dans cet exposé nous allons d'abord étudier les différents temps de cette technique en indiquant les critiques et les améliorations apportées, puis nous traiterons en détail la méthode que nous préconisons.

1° CHOIX DE LA SUBSTANCE GLYCUROGÉNIQUE :

Le corps susceptible d'être utilisé dans ce but doit présenter certains caractères. Il doit d'abord être peu

toxique, de façon à permettre son administration à doses relativement importantes et ceci pendant longtemps. On est donc obligé d'éliminer un certain nombre de composés qui, par ailleurs, pourraient présenter un certain intérêt, tel est par exemple le dinitrophénol 1-2-4, qui, après injection au chien ou au lapin, à dose toxique, augmente la quantité d'acide glycuronique urinaire jusqu'à 400 % (Georgescu) [82]. On peut, par contre, utiliser des corps comme le chloral, le benzène, le phénol, le salicylate de soude, le salol, le camphre, le bromure de camphre, le naphiol, l'antipyrine, le menthol, le bornéol, etc... Ce dernier peut être donné à des animaux, à des chiens en particulier, à la dose de 5 grammes journellement, pendant plusieurs semaines, sans causer aucun effet nocif apparent; nous avons quelquefois administré des doses de 10 grammes en une fois et la quantité totale que l'on peut donner en l'espace de trois mois est de l'ordre de 500 à 600 grammes.

Cette substance glycurogénique doit, en outre, provoquer la formation d'une grosse quantité de conjugué glycuronique qui puisse être rapidement et presque quantitativement isolée de l'urine. Bien que le nombre de ces conjugués déterminés qualitativement dans l'urine soit très considérable, fort peu sont susceptibles d'être des corps glycurogéniques utilisables pour la préparation de l'acide glycuronique. A ce point de vue le menthol et le bornéol sont les seuls qui aient pu donner satisfaction; l'un étant isolé sous forme de sel d'ammonium et l'autre sous forme de sel de zinc. Mais le bornéol glycuronide est obtenu avec un pourcentage

très supérieur. Dans ce but, il peut sembler préférable de porter son choix sur un composé qui se conjugue directement avec l'acide glycuronique sans oxydation ou réduction préalables. On ne connaît, en effet, ni le lieu, ni le mécanisme de ces phénomènes chimiques et il se pourrait que sous certaines conditions l'oxydation ou la réduction ne se produisent pas, rendant ainsi impossible la conjugaison glycuronique. Une telle éventualité pourrait faire croire à une incapacité de l'organisme animal à synthétiser l'acide glycuronique, alors que ce ne serait que la transformation chimique préalable qui ferait défaut. Cette cause d'erreur est éliminée par l'emploi de l'alcool secondaire qu'est le bornéol.

Un autre point important à considérer est le choix des animaux. A priori, n'importe quelle espèce d'animal pourrait être utilisée, mais l'expérience vient démontrer que certaines sont complètement inaptes à la production pratique des conjugués. C'est ainsi que de tous les animaux de laboratoire, le lapin semble être le seul susceptible de produire de l'acide menthol-glycuronique, le chien détruit le menthol ingéré et aussi d'ailleurs le menthol conjugué; en effet, après administration des deux substances on ne retrouve pas de menthol libre dans l'urine et seulement des traces de conjugués. Par contre, avec le bornéol, le chien élimine presque 50 % de cette substance sous forme de glycuronide, ce qui est d'autant plus intéressant, étant donné que l'on peut administrer à cet animal des doses de bornéol notablement plus élevées qu'au lapin. Chez ce dernier, en effet, le maximum d'acide

mentholglycuronique produit journellement par l'animal est à peine de 2 grammes. Quick [221] a fait des expériences chez l'homme et a trouvé qu'une dose de plusieurs grammes pouvait être prise impunément et que la réponse de l'organisme était prompte et l'élimination du conjugué plus importante qu'en expérimentant avec le chien ou le lapin. Le foie humain possède donc une grande capacité synthétique pour le bornéol glycuronide. Ces faits ont été confirmés par Pryde et Williams [213].

L'administration de la substance glycurogénique à l'animal est quelquefois difficile. On peut utiliser une solution huileuse de bornéol. Pour le lapin, nous nous sommes servis d'une sonde stomacale en caoutchouc, ceci ne va pas sans quelques inconvénients, aussi pour des animaux de grande taille il est préférable d'employer un autre procédé. Quick [221] mélange directement le bornéol à la nourriture. Nous avons au début opéré de cette façon, mais nous avons constaté que l'animal éprouve une répugnance invincible devant cette nourriture, dont il reconnaîtra par la suite facilement l'odeur forte et caractéristique. Il nous a été impossible de faire absorber de la sorte le bornéol, le chien refusant de manger. Nous avons essayé sans succès de soupoudrer des fragments de viande crue. Nous avons alors pulvérisé soigneusement le bornéol et nous avons confectionné de petites boulettes de viande crue, au centre desquelles nous avons déposé une certaine quantité de substance; un fil attachait le tout. L'animal avale la boulette sans la mâcher, c'est précisément ce qu'il faut obtenir, sans quoi elle est

en partie rejetée. Pryde et Williams [213] signalent la même difficulté dans l'administration du bornéol.

Quant à la façon de recueillir les urines, nous nous sommes servis d'une cage à métabolisme, une plaque finement grillagée retenait les matières, et l'urine était dirigée par une sorte de grand entonnoir métallique dans une cantine en verre graduée. De cette façon, on recueillait la totalité des urines sans perte, ce qui est important.

Goebel et Babers [80] recommandent d'administrer le bornéol quatre jours sur sept seulement. Dans ces conditions la santé des animaux est excellente et le rendement final en conjugué est plus élevé que celui obtenu avec des animaux traités sans interruption.

2° ISOLEMENT DU BORNYLGLYCURONIDE :

La meilleure substance glycuropénique est donc un corps terpénique bicyclique, dérivé du type camphanique, à fonction alcool secondaire; le bornéol. Il s'agit maintenant d'isoler de l'urine son conjugué glycuropénique. On peut diviser cette préparation en deux étapes : d'abord la précipitation du bornylglycuronide, sous forme de son sel de zinc, ensuite la libération de l'acide bornéolglycuropénique libre et sa purification.

a) PRÉCIPITATION DU BORNYLGLYCURONATE DE ZINC :
D'après Quick [221], l'urine est légèrement acidifiée et on la soumet à un traitement par l'acétate de plomb. Le filtrat jaune clair est chauffé à l'ébullition et on ajoute un excès d'acétate de zinc cristallisé. Un préci-

pité cristallin de bornéol glycuronate de zinc se produit aussitôt. Ce précipité est filtré immédiatement et lavé à l'eau chaude jusqu'à ce que l'eau de lavage n'entraîne plus de matière colorante. Cette opération étant réalisée dans l'urine acidifiée, aucun autre sel insoluble de zinc ne peut se former, à moins que ce liquide ne contienne de l'acide urique en quantité notable, qui serait alors précipité dans ces conditions. En traitant l'urine par l'acétate neutre de plomb, l'acide urique aussi bien que les pigments et les autres substances nuisibles, sont éliminés sans qu'il y ait la moindre perte du produit désiré. La méthode semble donc simple et spécifique.

En réalité, bien qu'ayant suivi scrupuleusement cette technique, il nous a été impossible au début de notre étude du procédé de Quick d'obtenir le précipité de bornéolglycuronate de zinc. L'addition d'acétate de zinc ne s'est trouvée suivie d'aucun phénomène particulier, pas même du plus léger louche du liquide. Nous avons continué à chauffer pendant un certain temps, nous avons ajouté une nouvelle quantité d'acétate de zinc jusqu'au voisinage de la saturation, sans plus de succès. Notre attention s'est immédiatement portée sur la manière dont nous avons recueilli les urines. Il était possible que la fermentation rapide ait fait disparaître la majeure partie du conjugué. Nous avons par expérience, en préparant l'acide mentholglycuronique, reconnu la fréquence de ce phénomène dans l'urine du lapin. Nous avons alors ajouté dans la cantine une faible quantité de fluorure de sodium dissout dans l'eau et le contenu de celle-ci a été traité le

lendemain matin avec un résultat négatif. D'autres précautions, telles que celle d'enduire de paraffine notre entonnoir métallique ou de prélever l'urine directement et de l'examiner immédiatement, n'ont pas donné un meilleur résultat. Il ne pouvait donc s'agir d'une disparition du glycuronide par fermentation.

Était-ce le fait de l'animal en expérience ? L'absorption du bornéol se révéla difficile, nous l'avons signalé, mais par le procédé des boulettes de viande, la quantité déterminée pouvait être intégralement absorbée. L'animal utilisé était une femelle gravide, cet état physiologique pouvait-il influencer sur la production du conjugué glycuronique ? Nous n'avons pas pensé qu'il put provoquer la disparition complète de ce mécanisme de détoxication. Nous avons pu, en effet, obtenir le glycuronide avant la fin de la période de gestation. A ce moment (1932) nous n'avons pas connaissance du travail de Nasarjanz [189]; cet auteur signale, en effet, une diminution de la capacité synthétique pour l'acide glycuronique chez les animaux vers la fin de la gestation.

Abandonnant la technique de Quick, nous avons alors essayé de varier les conditions d'expérience dans la préparation du sel de zinc. Nous avons étudié l'influence des variations de la réaction du milieu, l'influence de la température, etc... Nous avons concentré l'urine par évaporation lente au bain-marie, assez peu il est vrai. Tout cela ne nous a donné aucun résultat, pas plus d'ailleurs que l'augmentation de la dose de bornéol administrée à l'animal. Nous avons alors été amené à entreprendre l'étude de la technique primi-

tive de Fromm et Clémens, qui furent les premiers à préparer le bornéolglycuronate de zinc, en même temps que nous prenions connaissance des travaux effectués antérieurement sur ce conjugué.

C'est en 1883 que Pellacani [214] démontra que le bornéol introduit dans l'organisme est éliminé par les urines sous la forme d'un corps qu'il put obtenir à l'état cristallisé et qu'il reconnut comme étant un acide. Cet acide était facilement soluble dans l'eau, l'alcool, mais insoluble dans l'éther. Par hydrolyse, sous l'influence des acides minéraux dilués, il put obtenir un produit fugace, par extraction à l'éther et qui présenta des propriétés analogues à celles du camphérol obtenu par Schmiedeberg et Meyer. Le deuxième composé libéré par l'hydrolyse fut identifié avec l'acide glycuronique.

Les études de Pellacani furent continuées par Bonanni [21]. Celui-ci réussit à obtenir un acide conjugué pur de l'urine de chiens auxquels il avait administré du bornéol. Ce corps correspondait à la formule $C^{16}H^{26}O^7 + H^2O$, il était soluble dans l'éther, contrairement aux expériences de Pellacani. Il put préparer différents sels : ceux de potassium, de zinc et de cuivre, obtenus à l'état cristallisé, et ceux de baryum et de calcium, obtenus à l'état amorphe. Enfin, il reconnut que le produit non identifié, séparé par l'hydrolyse, était constitué par du bornéol. En même temps que Bonanni, Fromm et Clemens [68] étudièrent ce glycuronide. Ils purent obtenir le sel de zinc à l'état pur et ils en fixèrent la composition comme répondant à la formule $C^{32}H^{50}O^{14}Zn + 2H^2O$, démon-

trant ainsi que l'acide est monovalent. En partant de ce sel ils obtinrent l'acide libre en le traitant par l'acide sulfurique à 10 % en excès. Ils en fixèrent la constitution : $C^{16}H^{26}O^7$ et en déterminèrent le point de fusion : 174° - 175° . L'existence d'un nouveau conjugué glycuronique était ainsi définitivement prouvée.

Magnus-Lévy [165] étudia le pourcentage de bornéol combiné, et pour cela utilisa la méthode polarimétrique pour déterminer la quantité d'acide bornéolglycuronique présente dans l'urine des animaux d'expérience sous forme de sel de sodium. Il trouva que le quart seulement du bornéol introduit se retrouvait conjugué dans l'urine. Il put préparer le sel de sodium de cet acide et en préciser le pouvoir rotatoire spécifique. Sa formule est : $C^{16}H^{25}O^7Na + H^2O$, il perd son eau de cristallisation à 100° . Le pouvoir rotatoire du sel de sodium anhydre de l'acide *d* bornéol est de $[\alpha]_D^{21} = -36^{\circ},67$. J. Hämäläinen [108-110] dans un mémoire détaillé reprit les travaux précédents et étudia les glycuronides obtenus respectivement avec le bornéol racémique et les isomères optiques droit et gauche, ainsi qu'avec l'isobornéol.

Il utilisait comme animaux d'expérience des lapins, auxquels il faisait ingérer avec une sonde gastrique une solution huileuse de bornéol à 1 p. 6, deux fois par jour. La dose journalière était de 1,50 à 2 grammes. L'urine était recueillie et traitée toutes les douze heures par une méthode dérivée de celle de Fromm et Clemens indiquée ci-après :

L'urine limpide est additionnée d'acétate neutre de plomb, le précipité est lavé avec de l'eau plusieurs fois.

Le filtrat est traité par de l'acétate de plomb basique et le précipité obtenu est lavé plusieurs fois avec de l'eau chaude. Ce sel de plomb, qui contient le glycuronide, est broyé avec de l'acide sulfurique à 10 %. Le sulfate de plomb est filtré. Le filtrat de couleur rouge brun est neutralisé tout de suite avec du carbonate de baryum et le précipité de sulfate de baryum est éliminé par filtration, puis lavé avec de l'eau. Les filtrats sont concentrés lentement au bain-marie à une température moyenne. La masse visqueuse ainsi obtenue est extraite plusieurs fois par l'alcool absolu, le sel de baryum du glycuronide passe dans l'alcool. Les solutions alcooliques réunies sont évaporées au bain-marie et le résidu est précipité avec de l'éther. La portion insoluble est recueillie sur filtre et lavée soigneusement à l'éther. On obtient ainsi un corps qui, au début, est très blanc, mais qui, peu à peu, tombe en déliquescence et se transforme en une masse brune et sirupeuse constituée presque entièrement par du bornéol glycuronate de baryum. Ce composé est dissout dans le minimum d'eau et tout le baryum est précipité quantitativement avec une solution concentrée de sulfate de zinc, mais sans excès. On abandonne au repos douze heures. Le lendemain, le précipité est recueilli sur un filtre et l'eau mère brune est lavée avec de l'alcool absolu. Le résidu blanc qui reste sur le filtre est constitué par du sulfate de baryum et du bornéol glycuronate de zinc. On le chauffe avec de l'eau bouillante jusqu'à disparition de la réaction du zinc ! En concentrant les solutions aqueuses réunies, le bornéol glycuronate de zinc précipite sous forme d'aiguilles cristallines !

Nous avons renoncé à nous servir de ce procédé qui nous a paru mauvais. Le grand nombre de manipulations favorise les pertes de produits, et surtout l'extraction du sel de zinc par l'eau bouillante où il est si peu soluble doit se faire bien difficilement. Nous avons préféré étudier la technique primitive de Fromm et Clemens.

Le précipité produit par l'acétate basique de plomb comme précédemment est broyé soigneusement avec de l'acide sulfurique dilué. On filtre, et le sulfate de plomb est lavé avec de l'eau. On épuise les filtrats réunis avec de l'éther et on évapore la solution éthérée. Le résidu est évaporé à nouveau dans la cloche à vide sur chaux sodée. Il se prend en masse et le bornéolglycuronide cristallise. Nous avons utilisé cette solubilité de l'acide bornéolglycuronique dans l'éther et nous avons réussi à obtenir de fins cristaux mêlés d'impuretés colorées. Une seconde dissolution dans l'éther était nécessaire pour les purifier. On peut également neutraliser le résidu provenant de l'évaporation de l'éther avec de la soude ou de l'ammoniaque diluée; on additionne alors la solution neutre d'une solution de sel de zinc. Le bornéol glycuronate de zinc se sépare à l'état cristallisé. Cette méthode, dont nous venons de résumer brièvement le principe, permet d'obtenir le composé désiré, mais elle donne des rendements assez faibles.

Dans le but de trouver une préparation pouvant donner des quantités plus abondantes, nous avons étudié les différents temps de la technique.

Le traitement par l'acétate neutre de plomb n'en-

traîne pas de quantité appréciable du produit. Fromm et Clemens avaient trouvé que le précipité produit par ce réactif était exempt d'acide glycuronique. Il ne fournissait à la distillation avec l'acide sulfurique dilué que des quantités minimales de produit de séparations volatils. Au contraire, l'acétate basique de plomb entraîne bien la presque totalité du conjugué, nous avons trouvé préférable cependant de lui substituer l'acétate de plomb ammoniacal qui précipite entièrement les conjugués.

Nous avons songé, pour éliminer le plomb, à traiter le précipité obtenu par l'hydrogène sulfuré. C'est un procédé classique et qui a servi à beaucoup de chimistes s'occupant de la préparation des conjugués glycuroniques. Il consiste à mettre en suspension dans l'eau distillée le produit desséché, finement pulvérisé et tamisé et à faire passer ensuite un courant d'hydrogène sulfuré. Quand tout le plomb est précipité, on filtre à la trompe et on concentre dans le vide jusqu'à consistance de sirop. Mais cette façon d'opérer a soulevé de nombreuses critiques, nous reproduisons une partie de celles de Bernier [18] : « Les filtrations sont longues, les précipités obtenus avec plusieurs litres d'urine sont volumineux et exigent pour permettre le passage de l'hydrogène sulfuré, d'être mis en suspension dans une quantité assez élevée d'eau distillée. De plus, pour obtenir la décomposition intégrale du composé plombique, il faut maintenir le courant gazeux pendant un temps assez considérable et une seule opération est insuffisante, ainsi que je m'en suis assuré.

« Le précipité doit donc être délayé de nouveau

dans l'eau distillée et soumis une seconde et même une troisième fois à l'action du gaz sulfhydrique. Les liqueurs se trouvent ainsi assez diluées, et il devient nécessaire de les concentrer.

« Or, cette concentration, même opérée dans le vide, à basse température, fait prendre au liquide une coloration assez foncée. Dans le but d'éviter cette coloration, j'ai fait l'évaporation en présence de carbonate de chaux ou de carbonate de baryte, afin de neutraliser l'acidité, le produit final n'en était que plus coloré. »

De plus, tous les acides minéraux ou organiques contenus dans le précipité sont remis en liberté et rentrent en solution avec l'acide conjugué. Ils peuvent agir pour dédoubler celui-ci et le filtrat devient réducteur, ils agissent également sur le chromogène indigurique présent dans les urines et qui est, ainsi qu'Hervieux [111] l'a démontré un dérivé glycuronique de l'indoxyle, et peuvent le dédoubler en partie. On peut voir se former dans ces conditions des couleurs indigotiques. Ce grave inconvénient a été rencontré par tous les auteurs qui se sont occupés des glycuronides et avait déjà été signalé par Mayer et Neuberg [166]. Aussi Hervieux [111] propose, pour éviter cette action des acides, d'ajouter à la suspension dans laquelle doit passer l'hydrogène sulfuré une petite quantité de carbonate de potassium. La réaction se maintient alors neutre pendant le passage du courant gazeux. La substitution du sulfure de baryum à l'hydrogène sulfuré a été proposée dans le même but par Kotake [142], mais les sels de baryum formés restent en solution.

Nous avons donc abandonné cette façon d'opérer et avons utilisé l'acide sulfurique dilué; à la dilution de 10 % cet acide n'a pas d'action fâcheuse, le glycuronate est relativement assez stable et ne subit pas un dédoublement notable à froid.

L'acide bornéolglycuronique ainsi libéré, comment l'obtenir ? Nous nous sommes demandé si on ne pourrait pas l'isoler directement de ce liquide en l'insolubilisant sous forme de son sel de zinc, sans passer par des méthodes de purification intermédiaires, telle que sa solubilisation dans l'éther ou son passage sous forme de sel de baryum. Il nous semblait qu'en même temps nous pourrions accroître le rendement dans des proportions notables. C'est précisément ce que l'expérience nous a permis de vérifier. Quelques essais préliminaires s'étant montrés satisfaisants, nous avons traité l'urine de la façon suivante :

L'urine fraîche, filtrée, bien limpide, de réaction acide est déféquée avec un dixième de son volume de réactif de Courtonne et filtrée. Le filtrat est additionné du 1/10^e de son volume de solution d'acétate basique de plomb (extrait de Saturne), puis de la solution officinale d'ammoniaque pure à raison de 50 grammes par litre. Un volumineux précipité blanc remplit aussitôt le vase, on mélange par agitation et on laisse reposer quelque temps. Le précipité lourd tombe rapidement au fond du récipient, on décante alors le liquide surnageant qu'on filtre à la trompe sur un grand entonnoir de Büchner garni de deux rondelles de papier filtre. On lave soigneusement et plusieurs fois, par décantations successives, avec de l'eau ammoniacale,

puis on recueille le précipité sur le filtre et on le lave encore à l'eau chaude. On le dessèche à l'air libre. Ce produit, qui contient le bornylglycuronide sous forme de sel de plomb, se présente sous l'aspect d'une masse blanche, non hygroscopique, que l'on peut conserver facilement sans altération. Ce corps est finement pulvérisé et on le broie dans un mortier en verre avec une petite quantité d'acide sulfurique pur dilué au dixième, de façon à faire une pâte homogène et sans grumeaux, que l'on délaie petit à petit avec une plus grande quantité de solution acide. On place alors le mélange dans un ballon bouché et l'on agite fréquemment pendant un ou deux jours. On ajoute de temps en temps une faible quantité d'acide, jusqu'à ce que le filtrat ait une réaction acide persistante. Il serait préférable de refroidir fortement tous les réactifs pendant cette opération et de maintenir le ballon dans la glace fondante.

La précipitation plombique terminée, on filtre pour éliminer le sulfate de plomb. On obtient un liquide rougeâtre qui contient l'acide bornéolglycuronique et diverses impuretés, tel que l'acide acétique, et un peu d'acide glycuronique libre. On porte ce filtrat à l'ébullition rapidement; aussitôt l'ébullition commencée, on ajoute l'acétate de zinc cristallisé (environ 20 grammes pour chaque 100 cc. de liquide) on retire du feu, on agite, un volumineux précipité cristallin apparaît instantanément, on le recueille au bout de quelques secondes sur un filtre préparé à l'avance pour le séparer de ses eaux mères. On lave ensuite ce produit très soigneusement avec de l'eau distillée bouillante jusqu'à ce que l'eau de lavage n'entraîne plus aucune matière

colorante. Il faut effectuer ces opérations assez vite. On dessèche ensuite à l'air libre, puis à l'étuve à 37°. Nous avons ainsi obtenu un corps léger, très blanc, finement cristallisé, fort peu soluble dans l'eau froide (une partie du sel de l'acide *d* bornéolglycuronique se dissoudrait dans 432 parties d'eau environ à 20°), un peu dans l'eau bouillante, insoluble dans l'éther et l'alcool. Nous n'avons cependant pas pu obtenir ce produit à l'état pur (vérifié par un dosage de zinc).

Nous avons pu ainsi préparer une quantité notable de produit et cette obtention s'est révélée tout à fait régulière. Voyant la facilité avec laquelle nous avions le sel de zinc, après cet isolement préalable de l'acide sous forme de sel de plomb, nous avons de nouveau essayé de le préparer directement à partir de l'urine, et cette fois, à notre surprise, nous avons réussi. Notons cependant qu'à ce moment-là, l'animal recevait depuis plusieurs semaines vingt grammes de saccharose par jour et ingérait quotidiennement dix grammes de bornéol, soit une quantité double de celle administrée primitivement. On ne peut attribuer, nous semble-t-il, la réussite de l'opération uniquement à l'augmentation de la quantité du conjugué dans l'urine, autrement dit à la concentration plus forte du glycuronide dans le même volume. En effet, il nous est arrivé d'avoir tantôt des précipitations abondantes, tantôt au contraire assez faibles, alors que notre technique au plomb nous donnait des résultats réguliers. Nous avons déjà signalé que ce procédé nous avait permis d'obtenir le bornéol glycuronate de zinc, alors que la méthode directe ne nous avait rien donné. Enfin, cette

dernière ne nous a pas fourni de produit plus pur. Quick indique simplement dans son mémoire, qu'après lavage à l'eau chaude on obtient : « un produit cristallisé blanc de bornéolglycuronate de zinc, pratiquement chimiquement pur », il ne mentionne, pour prouver cette affirmation, ni dosage de zinc, ni analyse élémentaire. Nous avons bien, nous aussi, obtenu ce produit cristallisé blanc, mais il ne s'agissait pas d'un sel pur. Pryde et Williams [213] qui, après nous, ont étudié et modifié la méthode de Quick, ont pu obtenir, mais après purification, du bornéolglycuro-nate de zinc pur, vérifié par analyse et de formule $C^{32}H^{50}O^{14}Zn, 2H^2O$.

Ce procédé par précipitation directe est évidemment très pratique, mais il nous semble peu fidèle, il dépend en effet de facteurs plus complexes qu'on ne pourrait le croire, étant, soit le fait de l'animal en expérience, soit le fait de la concentration de l'urine en glycuronide, soit celui de l'influence des variations des composés normaux de l'urine qui peuvent entraver de façon plus ou moins intense la précipitation.

Quoiqu'il en soit, par l'emploi de l'une ou l'autre des méthodes que nous venons d'indiquer, on peut à l'heure actuelle préparer une quantité notable de bornylglycuronide sous forme de sel de zinc, il s'agit maintenant de l'isoler à l'état libre et de le purifier.

b) LIBÉRATION ET PURIFICATION DU BORNYLGLYCURONIDE : On met le glycuronide en liberté au moyen de l'acide sulfurique. Mais ici se pose une question importante, faut-il employer un acide de concentration

assez forte, de façon à réaliser une libération rapide, mais au risque d'hydrolyser une partie du conjugué, ou est-il préférable d'utiliser une solution plus diluée. Il est également très important de savoir si l'on peut s'aider de la chaleur pour la dissolution et à quelle température il faut porter le mélange. Après beaucoup de tâtonnements et d'essais préliminaires, qu'il est inutile de rapporter ici, nous croyons qu'en pratique on peut opérer ainsi : Si l'on a obtenu le sel de zinc pur, le dissoudre dans de l'acide sulfurique 3,5 Normal, en chauffant légèrement comme nous le verrons plus loin, sinon le corps demandant proportionnellement une quantité d'acide un peu plus considérable, employer de l'acide sulfurique à 5 % et éliminer les impuretés par extraction du conjugué à l'éther. Voici comment l'on peut opérer :

Vingt grammes de Bornéolglycuronate de zinc finement pulvérisé sont dissous dans 150 cc. d'une solution d'acide sulfurique à 5 % titrée. On chauffe légèrement au-dessus d'un Bunsen, en agitant vigoureusement, jusqu'à dissolution totale. Il est important de ne pas chauffer trop fort, la main doit toujours pouvoir supporter le contact avec le récipient, cependant la solubilisation doit être assez rapide, on est quelquefois obligé d'ajouter une faible quantité de la solution acide. Le liquide limpide, légèrement teinté de jaune brun, est refroidi immédiatement sous un courant d'eau glacée, puis porté à la glacière. Au bout de quelques heures (quatre heures environ), le liquide s'est pris en masse, par suite de la cristallisation de l'acide bornéolglycuronique. On le retire de la glacière. Il

ne faut pas laisser trop longtemps les cristaux en contact avec la solution acide.

Pour les purifier on les extrait par l'éther. La solution éthérée laisse comme résidu de l'évaporation un corps blanc, sec, qui est soluble dans l'eau et qui ne contient plus de zinc. Le résidu aqueux de l'extraction est divisé en deux couches, une couche brunâtre surmontant le liquide aqueux. On les sépare et on évapore le produit brunâtre, le résidu est constitué par un corps blanc crème, avec quelques points noirâtres, hygroscopique, de consistance molle, soluble dans l'eau. Il est dissout dans le minimum d'eau chaude, décoloré par très peu de noir animal et filtré à chaud, la solution est abandonnée à la glacière pour cristallisation. On obtient ainsi, après vingt-quatre heures, une masse cristalline d'un blanc très pur qu'on essore soigneusement. On peut faire subir la même série de traitements aux eaux mères. Une recristallisation des cristaux dans l'eau chaude achève la purification. On réunit les cristaux et on les dessèche dans le vide sulfurique.

Il est très difficile d'obtenir l'acide anhydre. Hämäläinen [110] l'avait déjà signalé. Quick [221] trouva qu'en les desséchant soigneusement, le produit présentait une quantité d'eau de cristallisation un peu variable, mais approximativement voisine d'une molécule d'eau. Au contraire, Pryde et Williams [213] reconnurent que le produit séché à l'air libre ou par l'acide sulfurique cristallisait avec 1,5 molécule d'eau. Il ne devenait anhydre que par chauffage à 137° dans le vide et sur l'anhydride phosphorique.

Nous n'avons pas pu obtenir notre produit anhydre par simple séjour dans le vide sur l'anhydride phosphorique à la température ordinaire. Le point de fusion déterminé au bloc de Maquenne par fusion instantanée était très nettement à 163°-164°. Hämäläinen [110] a obtenu une température de fusion de 163°-165° pour l'acide *r* bornéolglycuronique, 162°-163° pour l'acide *l* bornéolglycuronique et 164°-165° pour l'acide *d* bornéolglycuronique (1). Notre produit donnait avec l'eau une solution limpide, il était inodore, il ne réduisait pas directement la liqueur de Fehling, mais chauffé quelques instants à l'ébullition en présence d'un acide, il libérait le bornéol, facilement reconnaissable à son odeur et le liquide devenait fortement réducteur par suite de la mise en liberté de l'acide glycuronique. Nous obtenions une magnifique coloration avec la réaction à la naphtorésorcine, suivant Neuberg [190]. L'analyse de notre produit a donné les résultats suivants :

Formule : $C^{16}H^{26}O^7 + 1,5H^2O$.

Carbone calculé p. 100 = 54.

Carbone trouvé p. 100 = 53,38.

Le dosage du carbone a été fait par la méthode de Nicloux. Nous avons ainsi obtenu du bornylglycuronide pur.

(1) Il est à noter que Pryde et Williams [213] ont trouvé un point de fusion de 174°-175°, identique à celui trouvé aussi par Fromm et Clemens [68].

Cet acide bornéolglycuronique se présente sous forme d'aiguilles prismatiques microscopiques. Sa solubilité dans l'eau est d'environ 2 %, mais de très légères impuretés l'augmentent considérablement. Il est rapidement soluble dans l'eau chaude, dans l'alcool, dans l'éther, l'acétone, l'éther acétique, le nitrobenzène, la pyridine, pratiquement insoluble dans le chloroforme, la ligroïne et le benzène. Il appartient à la classe des glycuronides qui possèdent une liaison giucosidique et par conséquent il ne réduit pas la liqueur de Fehling. Le pouvoir rotatoire spécifique est variable suivant que l'on a affaire à l'acide *d* ou *l* bornéol. Pour l'acide *d* bornéol il est : $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37^{\circ}02$ et pour l'isomère lévogyre : $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -69^{\circ}03$ en solution aqueuse. Ceci n'a d'ailleurs par d'importance pour la préparation, car celle-ci utilisant du bornéol racémique, on obtient avec les animaux des mélanges. Comme les autres glycuronides, l'acide bornéolglycuronique est un acide relativement fort ; cependant il est plus faible que l'acide glycuronique libre et que le benzoylglycuronide. D'après Quick [56], comme le conjugué correspondant du menthol, il est précipité par une solution à demi-saturée de sulfate d'ammoniaque. Il semble qu'il s'agisse là de propriétés communes à plusieurs acides glycuroniques conjugués, car l'acide thymolglycuronique purifié et d'autres sont également précipités dans ces conditions.

3° HYDROLYSE DU BORNYLGLYCURONIDE :

La meilleure méthode d'hydrolyse sera celle qui effectuera le dédoublement d'une façon complète, en ayant le minimum d'influence destructrice sur l'acide

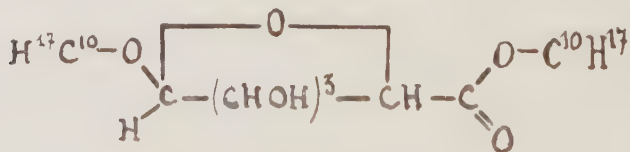
glycuronique formé. Dans ce but, Quick [221] songea à employer la technique d'hydrolyse d'Ehrlich et Rehorst [59]; elle permet, nous l'avons vu, d'obtenir l'acide libre bien exempt de lactone, cependant il préféra effectuer l'hydrolyse à l'ébullition et purifier ensuite le mélange d'acide et de lactone obtenu.

L'acide bornéol glycuronique est donc hydrolysé par le moyen de l'acide sulfurique N/5 à l'ébullition sous réfrigérant à reflux. Le bornéol libéré et insoluble dans l'eau est séparé par filtration. L'acide sulfurique est éliminé quantitativement par une solution d'hydroxyde de baryum. L'élimination complète de l'acide minéral est essentielle, car même à l'état de traces il entrave fortement l'isolement de l'acide glycuronique. On concentre le filtrat dans le vide, à consistance sirupeuse, on obtient bientôt une masse cristalline, qui n'est pas constituée par l'acide pur, mais par un mélange à 30 % de lactone environ. Cette transformation de l'acide en sa lactone a lieu pendant l'hydrolyse, car la solution immédiatement après cette opération contient pratiquement le même rapport d'acide et de lactone que le produit cristallisé. Quand l'hydrolyse se poursuit au bain-marie, comme dans la technique d'Ehrlich, au lieu de l'ébullition à feu nu, la quantité de lactone est moins grande, mais aucune technique d'hydrolyse n'a pu être trouvée jusqu'à présent qui donnerait uniquement l'acide pur.

Quick a préconisé une méthode pour la détermination quantitative de la lactone et de l'acide libre dans le mélange. Le dosage peut être effectué directement par titrimétrie au moyen d'une solution alcaline titrée

et en présence de phénolphthaléine comme indicateur. La neutralisation complète de l'acide est indiquée par le virage rose transitoire. Pour la lactone, la solution est chauffée à l'ébullition et titrée jusqu'à virage permanent.

Goebel et Babers [80], qui ont bien étudié la méthode de Quick, ont trouvé préférable d'éliminer l'acide sulfurique au moyen du carbonate de baryum, au lieu de l'hydroxyde, à cause de l'extrême sensibilité de l'acide uronique vis-à-vis des alcalis. Récemment, Swartz et Miller [255] ont critiqué la méthode d'hydrolyse de Quick. D'après ces auteurs, le dédoublement n'est pas complet, la solution contient encore des quantités appréciables d'acide bornéolglycuronique qui produit une abondante mousse pendant la concentration dans le vide. Au contraire, en éliminant par distillation et entraînement à la vapeur le bornéol produit au cours de l'hydrolyse, tout le bornylglycuronide est pratiquement dédoublé. Le rendement est de 69 %. En utilisant la méthode de Quick, ils ont obtenu un rendement de 52 % et ils n'ont jamais pu atteindre celui indiqué par l'auteur, c'est-à-dire plus de 80 %. Ils ont en outre mis en évidence la formation pendant l'hydrolyse, de quelque manière qu'elle soit conduite, d'un sous-produit qu'ils ont caractérisé comme étant un corps nouveau non isolé, le bornéol glycuronate de bornyle de formule suivante vérifiée par l'analyse :



4° PURIFICATION DE L'ACIDE GLYCURONIQUE :

La séparation de l'acide d'avec sa lactone offre des difficultés considérables parce que leur solubilité dans des solvants variés est trop voisine pour permettre une séparation vraiment tranchée. Quick a utilisé dans ce but la solubilité légèrement plus élevée de la glycurone dans l'alcool éthylique. En effectuant l'extraction du mélange par l'alcool à 95°, on peut obtenir un produit contenant plus de 99 % d'acide libre. Mais il est nécessaire de renouveler ce traitement par l'alcool plusieurs fois, au moins trois fois. Cette méthode n'occasionne pas de perte de matière, puisque la portion qui s'est dissoute dans l'alcool peut aisément être récupérée. Goebel et Babers [80] estiment que ce procédé, quoique bon, n'est pas très satisfaisant, car il donne des rendements trop faibles, aussi préconisent-ils une autre technique inspirée du principe précédent indiqué par Ehrlich et Rehorst. Ils transforment le mélange d'acide et de glycurone en lactone, qu'ils isolent à l'état pur. A partir de ce corps, ils préparent le glycuronate de baryum et le décomposent à basse température par la quantité théorique d'acide sulfurique, dans les conditions que nous verrons plus loin. La solution obtenue est concentrée à cristallisation et on fait recristalliser au sein de l'alcool éthylique.

5° PRÉPARATION DE LA LACTONE GLYCURONIQUE PURE :

Nous verrons qu'on peut transformer la glycurone en acide et inversement. Quick dissout le mélange

d'acide et de lactone précédemment obtenu, dans de l'acide acétique cristallisable, et à chaud. La lactone cristallise de la solution refroidie. On obtient ainsi un solide cristallisé légèrement brun, qu'on fait recrystalliser dans l'eau chaude.

IV. - Conclusion

Pour résumer toutes les considérations précédentes sur lesquelles nous avons cru utile de nous étendre aussi longuement, nous allons indiquer la marche à suivre générale de la technique qui nous paraît à l'heure actuelle être la plus adaptée à la préparation de l'acide glycuronique et de son conjugué :

1° PRÉPARATION DU BORNYLGLYCURONIDE :

Un ou plusieurs chiens sont placés dans des cages à métabolisme propres. On leur donne comme nourriture de la viande mélangée avec un peu de pain et salée. Pendant quatre jours consécutifs on leur fait ingérer, à chacun, au moyen de boulettes de viande, 7 grammes de bornéol finement pulvérisé, et 10 à 20 grammes de saccharose. Pendant les trois jours suivants on suspend l'administration du bornéol. L'urine des animaux est recueillie dans des cantines contenant un peu de fluorure de sodium et traitée tous les matins.

Pour cela, on commence par utiliser la méthode directe : On défèque soigneusement l'urine au moyen d'un dixième de réactif de Courtonne bien neutre. Le filtrat jaune clair est porté à une température voisine

de 70°. On ajoute alors environ 10 grammes d'acétate de zinc cristallisé à chaque 500 cc. de filtrat chaud. On retire du feu et on frotte les parois du verre avec une baguette de verre, un abondant précipité cristallin se produit. On filtre au bout de quelques instants et on lave soigneusement à l'eau distillée bouillante, de façon à éliminer toute trace de matière colorante. On purifie ce produit par ébullition avec de l'eau distillée, on filtre à la trompe, on lave encore à l'eau, puis à l'alcool et à l'éther et enfin on dessèche à l'exsiccateur. Avec des urines vieilles le rendement est faible et le produit coloré, de même si on le laisse quelque temps en contact avec les eaux-mères. Si l'on n'a pas obtenu la précipitation, utiliser la méthode indirecte au plomb que nous avons étudiée plus haut et préparer l'acide libre en suivant la technique déjà décrite. Si l'on a réussi à obtenir le sel de zinc pur, continuer comme suit :

Cinquante grammes de bornéolglycuronate de zinc pur et finement pulvérisé sont dissous dans 80 cc. d'acide sulfurique 3,5 Normal en chauffant légèrement dans les conditions que nous avons indiquées. Quand le sel est complètement dissous, la solution est rapidement refroidie et portée à la glacière. Après plusieurs heures la cristallisation de l'acide est complète. On lave alors le précipité avec très peu d'eau glacée. On le dissout dans l'eau chaude, on le décolore par le charbon et on recristallise plusieurs fois dans l'eau distillée chaude. On dessèche à l'air libre ou par acide sulfurique. Si le produit n'est pas pur, purifier par la méthode à l'éther.

2° PRÉPARATION DE LA LACTONE GLYCURONIQUE PURE :

100 grammes de bornylglycuronide sont dissous dans un ballon en pyrex de trois litres, au moyen de 1.500 cc. d'acide sulfurique N/5. Ce ballon est mis en connexion avec un appareil de distillation par entraînement à la vapeur d'eau, de façon à ce que cette dernière vienne barboter dans la solution acide. On chauffe cette solution à l'ébullition. On interrompt fréquemment la distillation pour enlever le bornéol qui s'est solidifié dans le réfrigérant. Au bout de deux heures on remarque dans le liquide la présence de gouttelettes huileuses qui augmentent au fur et à mesure. On continue l'opération pendant quatre heures, à ce moment l'élimination du bornéol est pratiquement complète. Le ballon à réaction est alors agité circulairement, de façon à rassembler les gouttelettes huileuses en un gros globule. On laisse refroidir pendant 12 heures. On filtre ensuite, de façon à éliminer la matière huileuse qui s'est solidifiée et qui contient le bornéol glycuronate de bornyle. Le filtrat, faiblement teinté de jaune, est traité par du carbonate de baryum pour éliminer quantitativement l'acide sulfurique, on sépare le sulfate de baryum par centrifugation, puis on décolore la solution par du charbon. Le liquide incolore est alors concentré sous pression réduite en consistance sirupeuse. On abandonne à la cristallisation, qui se produit au bout de plusieurs heures, le liquide se prenant en masse presque en totalité. On filtre, on lave, avec des petites quantités d'alcool jusqu'à élimination complète de toute trace de matière colorante,

et on dessèche. Les liqueurs mères, ainsi que les liquides de lavage, sont réunies et traitées de même pour obtenir une deuxième cristallisation. On obtient un beau produit cristallisé, constitué par un mélange d'acide et de lactone.

On pulvérise soigneusement 60 grammes de ce mélange desséché. On chauffe à l'ébullition au bain de sable électrique 600 cc. d'acide acétique glacial, contenu dans un vase d'Erlenmeyer de 1 litre. On ajoute la poudre précédente par petites portions, aussi rapidement que possible, dès que la solubilisation est obtenue, ce qui est facilité par une agitation mécanique. Dès que la dissolution est complète, le liquide est immédiatement refroidi. La lactone cristallise rapidement au sein du solvant. Après un séjour d'une nuit à la glacière, la lactone est séparée et lavée à l'éther pour éliminer l'acide acétique. On obtient 52 grammes de lactone. Pour obtenir un produit parfaitement blanc, il est important d'opérer la dissolution aussi rapidement que possible et de refroidir immédiatement après la solubilisation. Si la solution de glycurone reste pendant quelque temps à une température élevée, on obtient un produit impur coloré en brun. La durée totale de l'épuration ne doit pas dépasser quelques minutes. Le meilleur solvant à utiliser pour la recristallisation est l'alcool méthylique.

3° PRÉPARATION DE L'ACIDE GLYCURONIQUE PUR A PARTIR DE SA LACTONE :

11 gr. 40 de glycurone pure sont dissous dans 200 cc. d'eau; 10 grammes d'hydroxyde de baryum cristallisé

(un peu moins que la quantité théorique) exempt de carbonate $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 300 cc. d'eau. On ajoute quelques gouttes de solution de phthaléine. La solution alcaline est ajoutée petit à petit en agitant dans la solution de lactone, au moyen d'une boule en décantation, et de telle façon qu'à aucun moment la solution de glycurone ne devienne définitivement alcaline à la phthaléine. Dans ces conditions, le liquide reste clair et pratiquement incolore. Lorsque la totalité de la solution d'hydrate de baryum est ajoutée, ce qui demande environ une heure et demie, le liquide est concentré dans le vide jusqu'à 75 cc., décoloré à l'aide d'un peu de « norit », filtré et versé dans dix fois son volume d'alcool éthylique ou méthylique refroidi. Le sel de baryum de l'acide glycuronique précipite, il est isolé et desséché, soit 22 grammes, ce qui correspond à un rendement de 97 %. Ce composé est dissous dans 150 cc. d'eau refroidie à 0° et décomposé par la quantité théorique d'acide sulfurique 3 Normal. Le sulfate de baryum est séparé par centrifugation à 0° et est lavé avec de l'eau glacée. La solution de l'acide glycuronique est soigneusement concentrée dans le vide à consistance sirupeuse. La température de l'intérieur de la cloche à vide est maintenue à 16°. Le sirop obtenu est dissous dans l'alcool éthylique absolu, filtré et évaporé de nouveau presque jusqu'à siccité. L'acide cristallise, on le laisse séjourner à la glacière deux jours et on sépare les cristaux. On obtient 11 gr. 20 de produit. Une quantité appréciable peut encore être retirée des eaux mères, mais le corps obtenu contient une certaine proportion de

lactone. Par titrage avec une solution de soude, l'acide se révèle d'une pureté de 99,1 %. On le fait cristalliser encore au sein de l'alcool éthylique à 85° qui semble être le meilleur solvant dans ce but. L'acide finalement isolé serait rigoureusement pur à 100 % par titrage à la soude, et présenterait le pouvoir rotatoire déterminé par Ehrlich et Rehorst.

A propos des méthodes dont nous avons parlé, nous avons indiqué quels services elles pouvaient rendre, nous n'y reviendrons pas. Nous avons vu que certaines permettaient d'obtenir des solutions d'acide glycuronique, mais si l'on veut préparer une certaine quantité de produit pur, nous conseillons d'utiliser les techniques au bornéol, parce qu'elles permettent seules d'obtenir avec un rendement considérable et à l'état pur à la fois le conjugué, la lactone et l'acide.

La lactone et l'acide glycuronique purs étant ainsi préparés, nous allons maintenant passer en revue leurs propriétés physiques et chimiques.

Propriétés physiques

I. – De l'acide glycuronique

Nos connaissances actuelles sur les propriétés physiques de l'acide glycuronique sont surtout dues aux travaux d'Ehrlich et Rehorst [59], qui, les premiers, l'isolèrent à l'état libre. Après recristallisation dans l'alcool ou l'acétate d'éthyle, il se présente sous la forme de fines aiguilles cristallines blanches, solubles dans l'eau froide, où elles donnent une solution stable, légèrement solubles dans l'alcool éthylique. Après dessiccation dans le vide sulfurique, l'acide est anhydre et fond à $+ 154^{\circ}$ (1), avec dégagement de gaz et coloration. C'est un acide organique relativement fort, il présente une saveur aigre comparable à celle de l'acide acétique. Sa constante de dissociation ionique est de : $K = 1,0 \times 10^{-3}$ environ. Il présente un potentiel d'oxydo-réduction défini, on trouve un $rH = 15$ (Georgescu) [81]. Son pouvoir rotatoire spécifique est de $[\alpha]_D^{24} = +36^{\circ},26$, en solution aqueuse. En accord avec sa constitution d'acide dérivé d'un glucide, il présente le phénomène de la mutarotation. En effet, immédia-

(1) Il faut noter que Goebel et Babers [80] ont trouvé un point de fusion de 165° (corrigé) et Burkhart, Baur et Link [22] indiquent 163° .

tement après sa dissolution dans l'eau, il présente une rotation initiale correspondant à $[\alpha]_D^{24} = +12^\circ$, qui, au bout de deux à trois heures, a atteint la rotation finale maxima. L'acide obtenu par précipitation de sa solution alcoolique avec de l'éther, montre aussitôt après sa dissolution dans l'eau la rotation terminale. Cet acide uronique présente donc en solution aqueuse un équilibre entre deux modifications α et β . En se basant sur sa règle, Hudson calcula que le pouvoir rotatoire de la forme α devait être $+82^\circ$ et que celui de la forme β était de -5° . Dans ce but, Ehrlich et Rehorst [60] essayèrent en variant les solvants et les méthodes de préparation, la concentration et la température des solutions, d'obtenir les plus basses rotations, mais ils ne purent jamais atteindre des valeurs négatives. La rotation finale de l'acide de 0° à 20° et avec des concentrations variant de 0 gr. 50 à 3 gr. 30, resta toujours aux environs de $+36^\circ$. Contrairement aux glucides réducteurs, l'acide glycuronique atteint rapidement et à la température du laboratoire la rotation finale (environ deux heures).

L'acide glycuronique est stable en solution aqueuse, mais à froid. Si l'on chauffe la solution pendant plusieurs heures au bain-marie, l'acide se transforme petit à petit en lactone. Mais cette transformation est limitée, au bout de cinq heures on constate que la déviation polarimétrique est constante, correspondant à un équilibre du mélange formé alors d'environ 60 % d'acide et 40 % de lactone. La solution reste incolore et ne subit pas de décomposition notable. Lorsque l'acide glycuronique est exposé à l'air chaud et sec il

perd lentement de l'eau et commence à se transformer également en lactone.

Récemment, deux auteurs japonais, Takahashi et Asai [275], ont déclaré avoir obtenu par fermentation l'acide *l* glycuronique. La fermentation d'un bouillon au gluconate de calcium (10 %) pendant 24 heures à une température de 25°-28° conduirait au glycuronate de calcium (avec un rendement de 25 grammes pour 100 grammes de gluconate !). L'acide libre obtenu à partir de son sel calcique a été identifié par l'ensemble de ses propriétés chimiques (analogues à celles de l'isomère droit). Le pouvoir rotatoire de l'acide libre (ou de sa lactone ?) serait de $[\alpha]_D^{23} = -18^{\circ}5$, celui du sel de calcium est de $[\alpha]_D^{23} = -24^{\circ}$. Ce dernier se présente comme une poudre amorphe déliquescente à l'air et précipitée par l'acétate basique de plomb et la baryte. L'agent fermentaire utilisé est : « *Bacterium industrium* var *Hoshigaki* nov. sp. ». Ces auteurs ont aussi observé la formation de faibles quantités d'acide oxy-gluconique, $C^6H^{10}O^7, 2H^2O$ (?), obtenu pour la première fois par Boutroux [20] par fermentation et dont la constitution exacte n'est pas entièrement élucidée.

II. - De la lactone ou glycurone

C'est sous la forme de son anhydride que l'acide glycuronique a été d'abord connu [112]. Il se présente sous un aspect caractéristique très différent de celui de l'acide libre; ses cristaux sont en effet constitués

par d'épaisses tablettes monocliniques, transparentes. Cette lactone est très soluble dans l'eau, plus soluble dans l'alcool éthylique que l'acide (contrairement à l'affirmation qui se trouve dans de nombreux traités classiques qui la déclarent insoluble dans ce liquide). Sa saveur est sucrée et un peu amère. Les cristaux purifiés fondent à 180° (corrigé) avec décomposition. Le point de fusion n'est pas très net, souvent le produit se ramollit d'abord et brunit légèrement [80] ⁽¹⁾.

Elle présente un pouvoir rotatoire dextrogyre [112], mais moins prononcé que celui de l'acide : $[\alpha]_D^{18} = +19.25$ [59] ⁽²⁾, en solution aqueuse. On n'a pas mis en évidence de phénomène de mutarotation. A l'état sec la glycurone est stable, mais l'humidité et des traces d'acides minéraux brunissent les cristaux et les rendent déliquescents. Ses solutions aqueuses sont neutres au tournesol et stables à froid, même après plusieurs jours, on ne peut pas mettre en évidence la présence de l'acide libre. A la température du bain-marie une partie de la lactone se transforme en acide: à l'ébullition sous réfrigérant à reflux environ 50 % de l'acide est régénéré. Les alcalis, les carbonates alca-

(1) Le point de fusion que nous indiquons est celui du produit pur recristallisé dans l'alcool méthylique. Il existe quelques divergences à ce sujet entre les auteurs, dues probablement aux difficultés d'obtention à l'état pur. Thierfelder [273] indique 167°, Mann et Tollens [167] 170°-175° avec coloration brune et décomposition. D'autres : 175°-178° [59] ou 177°-178°.

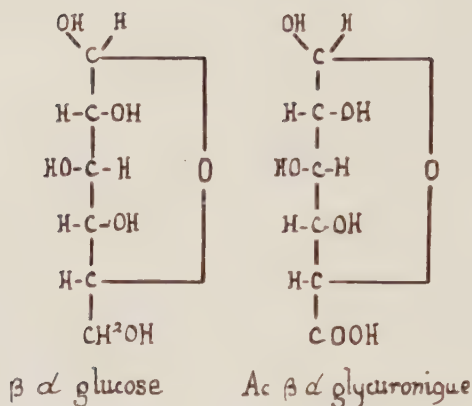
(2) On retrouve ici certaines différences : Mann et Tollens [157] trouvent en solution aqueuse et à 2 % $[\alpha]_D^{22.6} = +18.17$. Goebel et Babers [80] indiquent : $[\alpha]_D^{23} = +18.55$. D'après Thierfelder [273] la rotation spécifique paraît diminuer un peu pour des concentrations croissantes. Elle s'accroît avec la température.

lins ou alcalino-terreux opèrent la même transformation. Ainsi une solution de glycurone dissout le carbonate de baryum avec effervescence et production du sel de baryum de l'acide glycuronique.

Propriétés chimiques

I. - Constitution chimique - Les acides uroniques

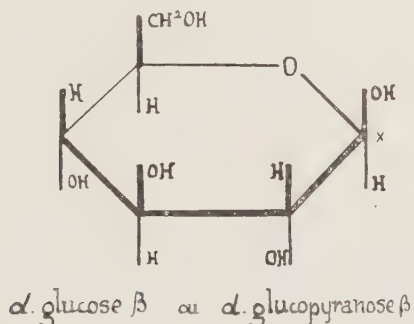
L'analyse élémentaire permet d'attribuer à l'acide glycuronique la formule brute suivante : $C^6H^{10}O^7$ de poids moléculaire: 194. Mais ses réactions aldéhydiques, sa transformation en acide saccharique par l'action du brome, sa production réalisée synthétiquement par réduction de la lactone de l'acide saccharique comme nous l'avons indiqué, permettent de fixer sa formule développée comme dérivant de celle du glucose. Enfin, à partir de cet hexose, nous avons vu que l'on pouvait par oxydation passer à l'acide gluconique puis à l'acide glycuronique, qui, en plus de ses propriétés réductrices, est un corps susceptible de donner des sels; il est monobasique. Sa constitution chimique répondra donc à la formule du glucose, mais dans laquelle la fonction alcoolique primaire aura été transformée en carboxyle acide. On sait que la constitution actuellement admise pour la structure du noyau oxydique du glucose stable est celle d'un anhydride 1-5, ou amyène oxyde ou pyranose. Le glucose β et l'acide glycuronique β peuvent, par conséquent, être représentés par les formules suivantes:



Dans cette formule nous avons attribué à l'acide glycuronique la même liaison oxydique que celle du glucose stable; ceci est démontré par des recherches récentes. En effet, Challinor, Hawort et Hirst [42] étudiant l'acide glycuronique isolé de l'acide aldobionique de la gomme arabique, ont préparé le triméthyl β méthylglycuronide cristallisé, et la comparaison de la vitesse d'hydrolyse de ce dernier avec celle du β méthylglucopyranoside leur a permis de déduire que le glycuronide présentait une structure pyranique. De leur côté Robertson et Waters [238] ont travaillé avec l'acide glycuronique de l'acide euxanthique; ils ont pu obtenir l'éther méthylique de la 2-3-4 triméthyl δ saccharolactone. Cette lactone fut obtenue indépendamment en partant d'un corps à structure pyranique vérifiée et par conséquent son isolement à partir des produits d'oxydation de l'acide triméthylglycuronique établissait la structure de ce dernier. Enfin, Pryde et Williams [213] ont réussi à préparer la même lac-

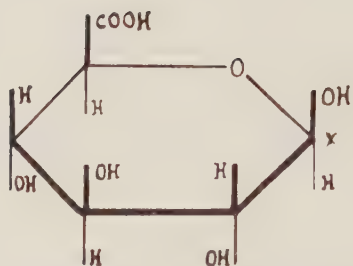
tone à partir de l'acide glycuronique isolé du β bornyl *d*-glycuronide produit par synthèse biologique. Il est donc prouvé définitivement que l'acide glycuronique, qu'il soit d'origine animale ou végétale, possède, comme le glucose dont il dérive, une structure du type pyranique.

On peut aussi représenter cet acide glycuronique en utilisant la nouvelle manière d'écrire les formules des oses proposée en 1927 par Goodyear et Haworth [78] (Bridel) [16]. Le symbole le plus approprié pour la formule d'un ose normal est celui qui représente le noyau comme un hexagone. Vu en perspective, on obtient le schéma suivant pour le glucose β :



Le groupe réducteur est à la pointe droite de l'hexagone marqué d'une astérisque et l'atome d'oxygène, voisin de ce groupe réducteur, est placé au-dessus.

La représentation de la formule de l'acide glycuronique est la suivante:

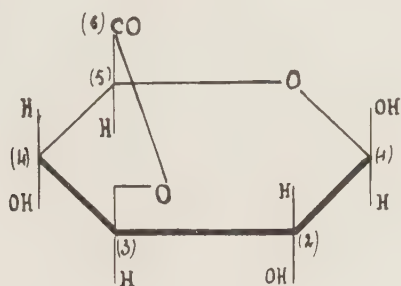


acide *d*.glycuronique (forme β)

L'oxhydryle réducteur est au-dessus du plan. La forme α serait représentée par une figure obtenue en faisant tourner les deux groupements autour de l'atome de carbone, l'atome d'hydrogène est alors placé au-dessus du plan et l'oxhydryle en-dessous. On remarque que, dans cette formule, le sixième atome de carbone, celui qui porte la fonction alcool primaire dans le glucose, est sous la forme d'une chaîne latérale, attachée au noyau, à l'atome de carbone voisin de l'atome d'oxygène et ne portant pas le groupe réducteur. Cette position en chaîne latérale fait comprendre facilement comment, dans des conditions appropriées, ce groupement subit l'oxydation en carboxyle, ce qui donne l'acide glycuronique. D'autre part, au contact de certaines bactéries, cet acide perd du gaz carbonique et donne du xylose. Le passage du glucose *d* au xylose *d* par oxydation et décarboxylation se comprend très clairement à l'aide de ces nouvelles représentations.

Nous avons vu que le groupement acide de l'acide

glycuronique peut donner naissance, dans certaines conditions, à un anhydride interne, ou lactone. La constitution exacte de ce corps n'est pas définitivement élucidée. Cependant, d'après les recherches de Pryde [212-211], on peut, à l'heure actuelle, représenter vraisemblablement la formule de la β glycurone comme suit:



Les acides uroniques

Depuis la suggestion de Ling [181], l'acide glycuronique est classé dans un nouveau groupe d'acides organiques que cet auteur a proposé de désigner sous le nom général d'acides uroniques. On peut définir ces corps comme étant des acides polyoxy-aldo ou céto-monocarboniques. Ils dérivent de l'oxydation des oses. Théoriquement, il doit exister autant d'acides uroniques que d'oses, mais pratiquement on ne connaît que fort peu de ces composés. Pendant longtemps, l'acide glycuronique fut le seul représentant. En 1926, Ehrlich et Sommerfeld [61] caractérisèrent un nouvel

acide isomère dérivé du galactose, l'acide galacturonique. Nelson et Cretcher [184], en 1929, isolèrent des produits d'hydrolyse de « *Macrocystis pyrifera* », un autre isomère dérivé du mannose, l'acide mannuronique, que Schœffel et Link [295] préparent à partir de l'acide alginique retiré du *Fucus serratus*. Enfin, tout récemment, Niemann [185] et ses collaborateurs ont réussi à réaliser la synthèse de l'acide d-l-alluronique. Mais on connaît d'autres représentants en dehors des acides hexo-uroniques. En effet, Bergmann [17] a préparé l'acide d-l-lyxuronique, dérivé d'un aldopentose, le lyxose, montrant que les acides uroniques n'étaient pas seulement dérivés des hexoses. Kiliani [139] a aussi obtenu l'acide 1-méthyl-l-arabinuronique à partir d'un méthylpentose, le rhamnose, par oxydation nitrique. On a pu aussi obtenir d'autres composés qui ne sont pas des acides aldo-uroniques, mais cétohexuroniques. Haworth et Hirst [106-107] ont préparé l'acide triméthylfructuronique, l'acide fructuronique lui-même n'a pas pu être isolé. Kitasato et Neuberg [140] ont préparé par synthèse un certain nombre d'acides cétouroniques.

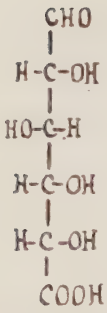
Ces acides uroniques ont des propriétés et des modes de préparation communs. C'est ainsi qu'en suivant les directives tracées par Fischer et Piloty [65], pour la synthèse de l'acide glycuronique, Niemann et Link [186] ont pu réaliser la synthèse de l'acide galacturonique par réduction au moyen de l'amalgame de sodium de la monolactone de l'acide mucique, et celle de l'acide mannuronique [186], par réduction de la

dilactone de l'acide mannosaccharique; établissant par là même leur constitution. C'est par un procédé analogue que fut réalisée la synthèse de l'acide d-l-alluronique à partir de la lactone de l'acide allomucique. Il est intéressant de remarquer que l'acide alluronique représente l'acide uronique de l'un des quatre derniers glucides isomères encore inconnus de la série de la dulcité, dont l'existence était démontrée depuis les célèbres travaux d'E. Fischer. Seul jusqu'à présent, en effet, l'acide bibasique (acide allomucique) du glucide inconnu (allose) avait été préparé.

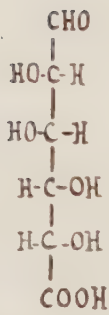
Ces substances donnent, par oxydation, les acides bibasiques correspondants qui peuvent servir à les caractériser. Chauffés avec de l'acide chlorhydrique à 12 %, elles donnent naissance à du furfurol et à de l'anhydride carbonique, dont la détermination quantitative permet un dosage de ces corps dans les matières végétales [53]. Elles donnent des dérivés caractéristiques avec la para-bromophénylhydrazine [187].

On connaît donc bien actuellement deux acides aldohexuroniques dérivant d'oses de la série de la mannite: l'acide glycuronique et l'acide mannuronique. Deux autres acides uroniques de la série de la dulcité sont également connus: l'acide galacturonique et l'acide alluronique. Les trois premiers acides ont seuls été rencontrés dans la nature et l'acide glycuronique est le seul représentant dans le règne animal.

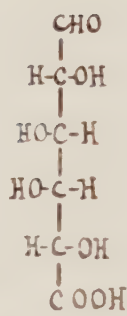
On peut représenter ces quatre acides par les formules suivantes:



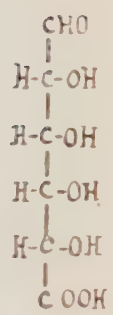
Ac. glycuronique



Ac. mannuronique



Ac. galacturonique



Ac. alluronique

II. – Propriétés liées à sa nature glucidique

Nous avons divisé un peu arbitrairement les propriétés de l'acide glycuronique en deux groupes: celles qui sont plus particulièrement liées à sa nature glucidique et celles qui sont dues à sa fonction acide.

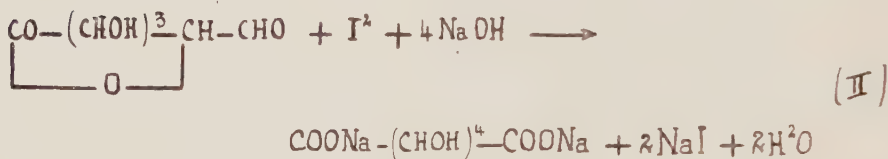
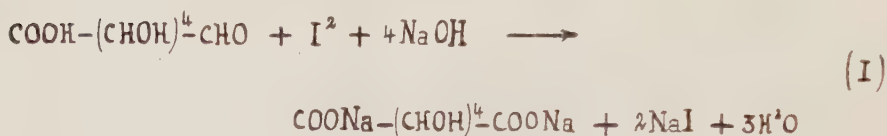
A. — PROPRIETES REDUCTRICES

En tant qu'acide aldohexuronique, l'acide glycuronique présente une propriété importante, c'est son pouvoir réducteur. Il est donc susceptible d'être oxydé par un grand nombre de composés.

1° OXYDATION PAR LES HALOGÈNES, L'ACIDE NITRIQUE, etc..., etc...

En présence de l'eau, le brome transforme l'acide glycuronique en acide saccharique, acide bibasique correspondant, $\text{COOH}-(\text{CHOH})^4-\text{COOH}$, dont le sel acide de potassium a été utilisé dans certaines conditions pour le caractériser (Thierfelder) [273]. L'acide azotique produit la même transformation. Gœbel et Babers [80] ont récemment étudié l'action de l'hypoiodite de sodium suivant la méthode de Willstätter et Schudel [290] respectivement sur l'acide et sa lactone.

Ils ont démontré que l'acide glycuronique et la glycurone sont tous les deux susceptibles de s'oxyder aux dépens de l'hypoiodite de sodium en excès, en milieu légèrement alcalin, en donnant le sel de sodium de l'acide saccharique suivant les équations:



Ils ont de plus cherché si cette réaction se produisait d'une façon quantitative; pour cela l'hypoiodite en excès (ou plus exactement l'iodate qui se forme à partir de l'hypoiodite en excès) est titré après acidification de la solution, par l'hyposulfite de sodium. L'acide glycuronique lui-même est oxydé suivant une proportion rigoureusement stœchiométrique, tandis que dans le cas de la lactone les résultats sont entachés d'une erreur par excès. Ceci peut s'expliquer, si l'on songe que la glycurone est instable en présence des alcalis, même à la température du laboratoire. La réaction entre cette substance, l'hypoiodite et la soude doit nécessairement être complexe, car on peut admettre que non seulement la fonction aldéhydique de la glycurone doit être oxydée en fonction carboxyle,

mais il y a rupture de la liaison lactonique et il est probable qu'à ce moment-là ce produit est plus sensible à l'action oxydante de l'hypoiodite. Cette réaction peut permettre un excellent dosage de l'acide glycuronique en solution pure, mais aussi en présence de cétooses, car ces derniers ne réagissent pas avec l'hypoiodite dans les conditions indiquées.

2° OXYDATION PAR LES HYDRATES MÉTALLIQUES EN MILIEU ALCALIN.

L'acide glycuronique, par le fait de sa fonction aldéhydrique, réduit les sels de métaux lourds en milieu alcalin. Les plus étudiés dans ce but, comme d'ailleurs dans le cas du glucose, sont les sels de cuivre bivalents, qui sont transformés à l'état de sels monovalents. C'est ainsi que l'acide glycuronique réduit la liqueur de Fehling à l'ébullition. Thierfelder [273] avait cru démontrer que son pouvoir réducteur était égal à celui du glucose, certains auteurs signalent même que cet acide est susceptible de réduire la liqueur de Fehling à froid à la température du laboratoire. En réalité, des études récentes ont montré qu'il était un agent réducteur plus faible que cet hexose; dans les mêmes conditions, un gramme d'acide glycuronique réduit une quantité correspondant à 0,9625 gramme de glucose. Des recherches précises ont été faites, ces derniers temps, en vue d'étudier la marche de cette réaction. On sait que, dans le cas du glucose, cette opération ne correspond pas à une équation chimique définie, conduisant à une réaction

régulière, mais on obtient cependant « empiriquement » des résultats exacts, si l'on opère dans des conditions bien définies. Uiwa [285] a appliqué la technique classique de G. Bertrand à l'étude du pouvoir réducteur de l'acide glycuronique et a établi expérimentalement des tableaux de correspondance entre le cuivre réduit et l'acide uronique. Gœbel et Babers [80] ont fait les mêmes déterminations, mais pour comparer les pouvoirs réducteurs de l'acide et de sa lactone. Ils ont obtenu des résultats analogues. Par la méthode de Bertrand, l'acide et la glycurone réduisent sensiblement la même quantité de cuivre. G. Scheff [256] a utilisé dans le même but la méthode de Shaffer et Hartmann, pour arriver aux mêmes conclusions. En utilisant les sels de cuivre, il n'existe donc aucune proportionnalité rigoureuse entre la quantité de cuivre réduit et celle de l'acide glycuronique présent; et il n'y a aucune espèce de relation numérique susceptible d'être calculée entre les poids moléculaires respectifs du glucose et de l'acide glycuronique et leurs pouvoirs réducteurs. Cependant, nous verrons que comme dans le cas du glucose, ces réactions peuvent être utilisées pour le dosage de cet acide, dans des conditions déterminées et en employant des tables de réduction obtenues expérimentalement.

3° OXYDATION PAR DIVERS COMPOSÉS.

L'oxyde de bismuth en solution alcaline (réactif de Nylander) est réduit à l'ébullition par l'acide glycuronique. L'azotate d'argent ammoniacal est également réduit. L'acide chromique provoque une décomposition en acides carbonique et formique et acétone

(Flückiger) [69]. Certaines matières colorantes sont également réduites, par exemple l'indigotine tétrasulfonate de potassium au moyen de laquelle Knecht et Hibbert [143] ont tenté de mettre au point une méthode de dosage.

B. — ETHERIFICATION — CONJUGAISON LES URONIDES

1° ETHERS OXYDES.

Grâce à la présence de ses nombreuses fonctions alcool secondaire, l'acide glycuronique est susceptible de former avec facilité des éthers oxydes. Ils peuvent se préparer par plusieurs techniques (méthodes de Purdie, Haworth, etc.) et donnent naissance à des combinaisons solides, cristallisables qui, comme pour les glucides, ont permis d'établir la structure de cet acide uronique.

Si ces premiers composés ont une grande importance théorique, ceux que donne la fonction réductrice présentent un réel intérêt. En effet, cette fonction $\text{OH}-\overset{\wedge}{\text{C}}-\text{H}$ peut se combiner par une liaison éther-oxyde avec les substances possédant un groupement alcoolique ou phénolique dans leur molécule, en donnant naissance à des corps comparables aux glucosides. C'est à ce type chimique que se rattache la grande majorité des substances connues sous le nom de conjugués glycuroniques. Comme les glucosides, ils sont susceptibles de se dédoubler sous l'influence des agents

hydrolytiques, tels que les acides minéraux dilués ou certaines diatases, en acide glycuronique et un composé aglycone qui peut appartenir aux séries les plus diverses de la chimie organique.

2° ETHERS-SELS.

Au lieu de réagir avec des corps à fonction alcool ou phénol, le groupement réducteur de l'acide glycuronique peut être éthérifié par un radical acide, pour donner naissance à un éther-sel. Cette réaction, toutefois, semble être assez exceptionnelle. D'après Pryde et Williams [215], l'acide benzoylglycuronique représenterait le type de cette deuxième catégorie de conjugués glycuroniques beaucoup moins nombreuse que la première, mais présentant des propriétés analogues. Thierfelder [273] avait remarqué que, si l'on agite une molécule de lactone glycuronique en solution avec neuf molécules de chlorure de benzoyle et douze molécules de soude, on obtenait un précipité d'acide dibenzoylglycuronique, $C^6H^8O^7 (C^7H^5O)^2$, insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool chaud et fusible à 107° .

3° LES URONIDES.

La plupart des auteurs récents désignent à l'heure actuelle les conjugués glycuroniques et les corps analogues sous le terme plus général d'uronides. Cette synonymie, proposée par Candlin et Schryver [41] a l'avantage de pouvoir s'appliquer aux combinaisons d'autres acides uroniques comme l'acide galacturonique par exemple. En effet, l'acide glycuronique n'est

pas le seul à constituer les uronides naturels, même non condensés. Hsieh Yü [113], étudiant la constitution chimique du *Buddleia*, a pu isoler un uronide qui se dédouble en propylpyrocatechol et un acide uronique indéterminé, mais qui n'est pas l'acide glycuronique. Suivant la nature de cet acide uronique, on aura des glycuronides, galacturonides, etc...

C. — REACTIONS COLOREES

L'acide glycuronique présente un grand nombre de réactions colorées, mais aucune n'est rigoureusement spécifique de ce corps. La plupart sont communes avec les pentoses, cependant une seule permet une caractérisation assez nette.

1° COMMUNES AVEC LES PENTOSEs OU NON CARACTÉRISTIQUES.

Nous avons vu que cet acide pouvait, dans certaines conditions, se transformer en pentose par décarboxylation. D'autre part, ces glucides, sous l'influence des déshydratants, sont susceptibles de se cycliser avec formation de dérivés furaniques (furfurol, par exemple), qui donnent avec les polyphénols des produits de réaction colorés. La plupart des réactions que nous allons indiquer sont dues à la formation de furfurol.

Si ces opérations s'effectuent sur l'urine, il sera nécessaire d'hydrolyser ce liquide par l'acide sulfurique, pour dédoubler les conjugués glycuroniques.

On peut opérer soit sur l'urine hydrolysée, filtrée et neutralisée par le carbonate de baryum, soit opérer une défécation à l'acétate neutre de plomb ou à l'acétate mercurique. Il faut bien se garder d'employer l'azotate mercurique, car l'azotate de sodium présent dans la liqueur terminale fournirait de l'acide azotique, avec l'acide chlorhydrique des réactifs. Le premier en présence de l'excès d'hydracide donnerait de l'eau régale qui détruirait la couleur.

a) RÉACTION DE BIAL A L'ORCINE. — Découverte par Tollens [276-277], elle a été modifiée par Bial [23₁₋₂].

La formule du réactif est la suivante [23₋₃] :

Orcine pure	1 gr.
Acide chlorhydrique	500 cc.
Solution officinale de perchlorure de fer	XXV gouttes

On chauffe à l'ébullition 5 cc. de réactif dans un tube à essais, on y laisse tomber quelques gouttes, au minimum 1 cc. du liquide à étudier. Il se forme un précipité foncé succédant à une coloration du liquide en vert-bleu. On centrifuge et on dissout le précipité dans l'alcool amylique. La solution obtenue est colorée en vert plus ou moins foncé. Examinée au spectroscope, elle présente une bande d'absorption entre le rouge et le jaune, entre les raies C et D. On peut observer parfois une deuxième bande au commencement du rouge et une dans le vert provenant de l'orcine employée en excès.

G. Scheff [257] a proposé une méthode de dosage

spectrophotométrique de l'acide glycuronique en solution pure utilisant la réaction à l'orcine. Un cc. de substance est mélangé avec 4 cc. de réactif de Bial, chauffé dix minutes au bain-marie bouillant et refroidi sous un courant d'eau. La coloration verte est extraite avec une quantité exactement mesurée d'alcool amylique. Les acides conjugués se comportent comme l'acide libre.

D'après Kraft [144], il suffit de chauffer très légèrement avec les pentoses, tandis qu'avec l'acide glycuronique il est nécessaire de porter à l'ébullition. Après de nombreux essais, Bernier [18] conclut que cette distinction est difficile à admettre. Van Leersum [147] prétend avoir obtenu la réaction avec toutes les urines et même avec des solutions de glucose à 0,10 %, alors que pour d'autres auteurs (Hervieux) [114] le glucose, le galactose et le lévulose donnent des colorations jaune brun, et un spectre ne présentant rien de caractéristique. Ce réactif ne peut donc être utilisé pour la recherche de l'acide glycuronique que dans des conditions déterminées.

b) RÉACTION DE TOLLENS [277₂₋₃] A LA PHLORO-GLUCINE. — On mélange dans un tube à essais un égal volume du liquide à essayer et d'acide chlorhydrique de densité 1,19; on ajoute quelques centigrammes de phloroglucine et on porte au bain-marie bouillant. Il se produit une coloration rouge brun qui peut donner lieu à la formation d'un précipité qu'on peut recueillir par centrifugation et dissoudre dans l'alcool éthylique à 95°. Il vaut mieux, ainsi que le recom-

mande Neuberg [191], agiter le mélange, après refroidissement, avec de l'alcool amylique qui se colore en rouge foncé en présence de l'acide glycuronique ou des pentoses. Cette solution, examinée au spectroscope, montre une bande d'absorption très nette entre le jaune et le vert, entre les raies D et E.

Salkowski [258] prétend que la coloration rouge obtenue passe peu à peu au vert sombre avec les pentoses, alors qu'avec l'acide glycuronique elle deviendrait brune.

c) RÉACTION DU FURFUROL. — L'acide glycuronique comme les pentoses donne facilement du furfurol par chauffage de ses solutions avec l'acide chlorhydrique. On caractérise ce dérivé furanique par la réaction à l'acétate d'aniline (Hervieux) [111].

Ce réactif se prépare d'après la formule suivante:

Aniline incolore	5 cc.
Acide acétique	2 cc.
Eau distillée	5 cc.
Alcool éthylique à 95°	5 cc.

On distille une certaine quantité du liquide à essayer (25 ou 50 cc.) avec un égal volume d'acide chlorhydrique de densité 1,06. On additionne le distillat de quelques centimètres cubes de réactif, il se développe immédiatement une belle coloration rouge grenadine, très voisine de la teinte d'une solution alcoolique d'éosine.

On peut opérer plus rapidement à l'ébullition dans un tube à essais avec l'acide chlorhydrique. Un papier imprégné de réactif plongé dans la lumière du tube se colore en rouge pourpre.

On peut aussi employer, au lieu d'acétate d'aniline, le salicylate ou la métaxylidine recommandée par Schiff [259]. Quoique très sensible, cette réaction a le même inconvénient que les précédentes; elle n'est même pas spécifique des pentoses, car d'autres sucres, tels que le glucose et le saccharose, dégagent de faibles quantités de furfurol.

d) RÉACTION AU NAPHTOL- α [169-83]. — La réaction primitive de Molisch s'obtient quand on additionne le liquide étudié d'une solution sulfurique de naphtol- α . Pour bien apercevoir la coloration, il faut opérer sur des liqueurs très diluées. Il se développe alors une coloration rouge violacée ou violette, qui se dissout en jaune dans l'alcool ou l'éther. Elle est due, comme l'a montré Udransky [284] à la formation de furfurol et elle se produit non seulement avec les sucres particulièrement les pentoses, mais encore avec les matières albuminoïdes et les gommés.

Goldschmiedt a légèrement modifié la réaction, une trace d'acide glycuronique dissous dans 0 cc. 5 d'eau donne, après addition de I à II gouttes de solution alcoolique de naphtol- α à 15 % et de 3 ou 4 c.. d'acide sulfurique concentré, une coloration vert émeraude qui devient bleue ou violette par dilution dans l'eau. Cette réaction est positive avec l'acide glycuronique, sa lactone et les uronides d'origine animale ou végé-

tales. D'après l'auteur, elle serait négative avec les hexoses et les pentoses (?). Avec l'urine normale elle est généralement positive. On opère de la même façon, mais avec un centimètre cube d'urine on fait couler doucement l'acide. A la limite de séparation apparaît un anneau violet augmentant en largeur du côté de l'urine, tandis que l'acide se colore peu à peu en vert. Une cause d'erreur a été signalée par Goldschmiedt [84] due à la présence de l'acide nitrique ou des nitrates. Askenstedt [1] a modifié la réaction de la façon suivante: l'urine à examiner est diluée avec de l'eau jusqu'à une densité voisine de 1. A 10 cc. de cette urine diluée, on ajoute une ou deux gouttes d'une solution à 1 % d' α -naphthol dans la glycérine et ensuite 10 cc. d'acide chlorhydrique ($D=1,19$). On mélange par renversement une ou deux fois. On abandonne ensuite le tube au frais et à l'abri de la lumière pendant 12 heures environ. Après quoi, on lit la réaction en lumière réfléchie. Normalement le liquide reste incolore ou montre une très légère teinte bleue. S'il y a présence notable de conjugués, il apparaît une couleur bleue teintée de rouge.

e) RÉACTION DE NICOLAS [192]. — L'auteur a proposé pour la recherche des conjugués glycuroniques dans l'urine, une réaction basée sur la production de furfurool par chauffage avec de l'acide chlorhydrique. Grâce à ses propriétés aldéhydiques, le furfurool produit peut se combiner à l'indoxyle en formant une indogénide dont les solutions dans le chloroforme, le benzène et surtout le sulfure de carbone présentent une fluorescence verte très intense.

f. — RÉACTION DE BELA DE BITTO [114]. — Le liquide examiné est additionné d'un égal volume d'une solution alcoolique saturée de métadinitrobenzène, on ajoute quelques gouttes de soude, et on chauffe. On voit apparaître des stries rouges et la liqueur prend finalement une teinte uniforme violette. Bernier [18] a obtenu cette réaction avec une solution d'arabinose à 1 pour 50.

g) RÉACTION DE RUBNER. — L'acétate de plomb ammoniacal chauffée avec une solution d'acide glycuronique, produit un précipité rouge chair, comme avec le glucose.

h) RÉACTION DE DENIGÈS [54]. — L'auteur a montré que les pentoses, surtout le xylose, se condensaient à froid avec la codéine, en milieu sulfurique, en fournissant une coloration violette ou vineuse. L'acide glycuronique, en tant qu'acide xylose carbonique, donne aussi cette réaction à chaud.

On place dans un tube à essais 0 cc. 1 d'une solution de codéine à 1 pour 20 (1 gramme de codéine dans 20 cc. d'alcool éthylique à 90°), 2 cc. d'acide sulfurique pur ($D=1,84$) et 0 cc. 4 d'une solution aqueuse d'acide glycuronique; on agite et on porte le mélange, pendant 4 ou 5 minutes, au bain d'eau bouillante; il se développe une coloration rouge pourpre présentant une large bande d'absorption couvrant le jaune et le vert du spectre.

Cette coloration est très intense à des concentrations de 1 à 2 grammes par litre, nette à une concentration de 2 centigrammes. La sensibilité maxima est évaluée

par Denigès à 4 millièmes de milligrammes d'acide dans la prise d'essai.

i) RÉACTION DE MEYER ET JEANNIN [163]. — Pour la recherche des conjugués glycuroniques dans l'urine, les auteurs proposent d'opérer ainsi : l'urine est additionnée d'une solution concentrée de nitroprussiate de soude récemment préparée, on agite, puis on alcalinise par de la soude caustique à 10 %. On obtient une coloration rouge foncée. Cette coloration disparaît presque complètement si l'on ajoute de l'acide acétique, ou du moins il ne persiste qu'une faible teinte rose pâle ou faiblement orangée.

Si la coloration ne se produit pas ou faiblement, refaire l'opération sur de l'urine fraîche préalablement traitée par quelques gouttes d'acide chlorhydrique, chauffer légèrement quelques instants pour hydrolyser les conjugués glycuroniques, puis ajouter le nitroprussiate.

Cette réaction présente de l'intérêt en ce sens qu'elle utilise un réactif courant dans les laboratoires, nous l'avons néanmoins classée ici, car des recherches ultérieures sont nécessaires pour en démontrer la spécificité.

2° PLUS CARACTÉRISTIQUE DE L'ACIDE GLYCURONIQUE.

Nous voulons parler de la réaction colorée à la naphtorésorcine qui a suscité un grand nombre de travaux. Nous l'étudierons en détail dans la deuxième partie de cette thèse.

D. — ACTION DES ACIDES — DES ALCALIS REACTIONS DIVERSES

Déjà avant de savoir que l'urine normale contenait des conjugués glycuroniques, divers auteurs avaient remarqué qu'elle renfermait des corps susceptibles de donner naissance à du furfurool par distillation avec les acides [167]. C'est ainsi que de Chalmot, Gunther et Tollens [85] obtenaient par ce procédé environ 25 milligrammes de furfurool à partir de 200 cc. d'urine. Thierfelder [273] a ensuite vérifié que l'acide glycuronique et son anhydride fournissent par chauffage avec de l'acide chlorhydrique étendu (12 %) de grandes quantités de furfurool et du gaz carbonique. Il a étudié les produits de décomposition et a décelé un peu d'acide formique. Cette réaction est importante, car elle a servi de base à de nombreux dosages.

Chauffés avec de la potasse concentrée, l'acide glycuronique et sa lactone donnent, comme le glucose, une solution brune, en même temps qu'il se forme de la pyrocatéchine et de l'acide protocatéchique; mais l'acide lactique que fournit le glucose est ici remplacé par l'acide oxalique. L'amalgame de sodium le réduit à l'état d'acide gulonique isomère de l'acide glucuronique [65].

L'acide glycuronique ne fermente pas avec la levure de bière, mais il subit cependant la fermentation, ainsi que nous le verrons, sous l'influence de nombreux microorganismes. Bernier [18] avait remarqué que les moisissures cultivent très bien sur ses solutions et sur celles de glycuronate de baryte.

E. — COMBINAISONS AVEC LE GROUPEMENT NH^2

Ce groupement peut être fourni par une foule de corps qui se combinent à la fonction aldéhydique de l'acide glycuronique pour donner naissance à un grand nombre de composés.

Le plus simple est celui donné par l'hydroxylamine qui, par élimination d'eau, fournit une oxime. L'oxime de la lactone glycuronique a été préparée par Neuberg [193] et par Giemsa [86]. La semi-carbazine donne une semi-carbazone; celle de la glycurone a été étudiée par Giemsa [86]. Neuberg [193] a pu obtenir la thio-semi-carbazone. D'après Thierfelder [273], le glycuronate de potassium se combine avec une molécule d'aniline, avec élimination d'une molécule d'eau; et deux molécules de glycuronate se combinent avec une molécule de toluylène diamine, avec élimination de deux molécules d'eau. Ces combinaisons seraient tout à fait semblables aux composés analogues que donne le glucose, elles sont lévogyres. La combinaison avec l'aniline a été obtenue depuis par Bergmann et Wolff [15].

Mais les combinaisons les plus importantes sont celles qui sont obtenues avec les hydrazines aromatiques. Avec la phénylhydrazine on pourrait obtenir théoriquement l'hydrazone, puis l'osazone. La phénylhydrazone de l'acide glycuronique a été préparée par Giemsa [86]. Quant à la glycuropénylosazone, ce nom a été donné à des combinaisons un peu différentes successivement par Thierfelder [273], Neuberg et Neimann [195], Bernier [18] et récemment par Chouchak

[45]. Il semble bien, comme nous le verrons, que dans certains cas il se soit agi plutôt de l'osazone-hydrazide.

La parabromophénylhydrazine peut donner plusieurs combinaisons avec l'acide glycuronique; elles ont été l'objet de nombreux travaux souvent contradictoires, que nous étudierons plus loin. Signalons seulement ici la parabromophénylhydrazone de la lactone glycuronique [193-86] et surtout l'osazone du sel de baryum (Goldschmiedt et Zerner [87]).

D'autres composés ont été obtenus soit avec l'acide glycuronique, soit avec son anhydride, citons l' α méthylphénylhydrazone [115], l' α benzylphénylhydrazone [15] [115], la paranitrophénylhydrazone [136] [115], la diphénylhydrazone [115], les para et ortho tolylhydrazones, les combinaisons diverses avec la β naphthylhydrazine [115], l'ortho et la méta nitrophénylhydrazine [115] et la para bromophénylhydrazine [193].

Enfin, par sa fonction COOH libre, l'acide glycuronique peut donner avec les hydrazines des hydrazides. Levene et Lopez-Suarez [148] ont obtenu la phénylhydrazide de l'osazone et, plus tard, Bergmann et Wolff [15] l'hydrazone hydrazide.

Dans son livre très documenté, A.-W. Van der Haar [115] a étudié toutes ces combinaisons du point de vue de leur spécificité et de leur valeur d'identification. De l'avis de la majorité des auteurs qui se sont occupés de la question, deux composés seulement sont indiqués pour la détection de l'acide glycuronique, ce sont les combinaisons avec la parabromophénylhydrazine et avec la phénylhydrazine, dont nous nous occuperons plus loin en détail.

F. — PRODUITS DE CONDENSATION
LES ACIDES POLYGLYCURONIQUES
LES POLYURONIDES
LES ACIDES ALDOBIONIQUES

Comme les glucides, l'acide glycuronique est susceptible de donner des produits de condensation, ou plusieurs molécules d'acides sont combinées entre elles, laissant libres les carboxyles. Ces acides polyglycuroniques avaient été signalés comme constituants de certaines plantes (phanérogames ou cryptogames) dans les substances squelettiques et les tissus de soutien du Hêtre [2]. E. Schmidt et Vocke [260] auraient découvert une source importante de ces corps chez certaines algues brunes. Après traitements successifs par l'acide chlorhydrique dilué, par l'ammoniaque, puis par l'acide sulfurique, etc., ils ont isolé ces acides sous deux formes : une forme « A » stable même sous l'influence d'une attaque vigoureuse et une forme « B » facilement hydrolysable et qui libère rapidement l'acide glycuronique. Ces corps sont solubles dans les alcalis et dans le sulfite de soude. Le mélange des deux formes dégage, sous l'influence de l'acide chlorhydrique, du gaz carbonique et du furfurole; il donne la réaction à la naphtorésorcine. Fait curieux: ils sont levogyres. L'acide A aurait un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_D = 147^{\circ}8$. Ces substances ont été encore peu étudiées, leurs formules et leur constitution ne sont pas encore bien établies. Mais il semble que ce soit là une propriété

générale des acides uroniques. On sait, en effet, depuis les recherches d'Ehrlich et de ses collaborateurs, que le noyau fondamental des pectines est constitué par un acide tétrabasique: l'acide tétragalacturonique, dont la constitution est connue [62].

Ces acides polyuroniques par leurs fonctions restées libres, peuvent donner une série de combinaisons, soit avec des molécules d'hexoses ou de pentoses, soit par éthérification de leurs carboxyles ou des OH alcooliques. Ces complexes primaires ainsi obtenus peuvent présenter des condensations encore plus élevées analogues aux polyoses (amidon, inuline, etc.). C'est à ces combinaisons simples ou plus complexes que Candlin et Shryver [41] ont proposé de réserver le nom de polyuronides. Nous verrons des exemples de ces dérivés dans divers produits végétaux comme les gommés, certaines capsules microbiennes, etc... leurs sels alcalino-terreux sont peu solubles.

Des exemples très simples de ces polyuronides sont représentés par les acides aldobioniques. On désigne sous ce terme des substances formées d'une molécule d'acide uronique et d'une molécule d'hexose ou de pentose. Ces corps sont combinés suivant le type glucosidique, la liaison se fait en effet entre la fonction aldéhyde de l'acide uronique et un des OH primaire ou secondaire du glucide. Un des plus étudiés est celui qui existe, comme nous le verrons, dans la gomme arabique, c'est un acide galactoglycuronique.

III. — Propriétés liées à la fonction acide

Comme tout acide, l'acide glycuronique est susceptible de donner des sels et des éthers-sels. Un assez grand nombre de ces composés ont été préparés.

A. — SELS DE L'ACIDE GLYCURONIQUE

C'est Thierfelder [273] [274] qui le premier a entrepris une étude des sels de cet acide uronique. Il a montré qu'une solution de glycuronate de potassium à 10 % n'est pas précipitée par des solutions également concentrées des sulfates de zinc, de cadmium, de cuivre, par le perchlorure de fer, l'acétate de mercure, les nitrates de strontium et d'argent. Les sels de calcium, de baryum, de zinc, d'argent, de cadmium et de cuivre n'ont été obtenus par cet auteur qu'à l'état amorphe. Le sel de plomb a été obtenu une fois par Schmiedeberg et Meyer [248] en aiguilles incolores. Ehrlich et Rehorst [59] [60] ont vérifié ces résultats et ont donné des méthodes de préparation plus exactes, en même temps qu'ils obtenaient d'autres sels et fixaient les constantes physiques de ces composés.

Une solution aqueuse d'acide glycuronique ne donne aucun précipité avec le nitrate mercurique [18]; elle

n'est pas précipitée non plus par l'acétate neutre de plomb; avec du sous acétate de plomb, le sel basique de plomb précipite [59], le sous acétate de plomb ammoniacal précipite entièrement l'acide glycuronique. Avec de l'eau de baryte en excès le sel de baryum précipite si l'on chauffe.

Le GLYCURONATE DE SODIUM se prépare par neutralisation incomplète au moyen d'une solution décimormale de soude dans l'alcool à 80°, d'une solution d'acide glycuronique pur effectuée dans l'alcool éthylique à 80° en chauffant légèrement (1 p. 40 environ). Le sel de sodium précipite à l'état colloïdal et se transforme bientôt en petits cristaux en forme d'aiguilles, ces cristaux sont essorés, lavés avec de l'alcool et de l'éther et séchés jusqu'à poids constant sur l'acide sulfurique dans le vide. Ce corps contient une molécule d'eau de cristallisation et correspond à la formule: $C^6H^9O^7Na$, H^2O . Il présente le phénomène de la mutarotation, son pouvoir rotatoire spécifique en solution aqueuse est à $[\alpha]_D^{20} = +22,51$ au bout d'une heure et demie environ.

GLYCURONATE DE POTASSIUM: 25 cc. d'une solution alcoolique d'acide glycuronique pur à 2 % sont neutralisés presque complètement par une solution alcoolique de potasse normale. Il se forme un précipité d'apparence visqueuse d'un blanc très pur. On le dissout par addition de 15 cc. d'eau et en chauffant légèrement au bain-marie. Du filtrat se sépare déjà par refroidissement une petite quantité de sels de potassium sous forme d'aiguilles cristallines. On pré-

cipite le reste par de l'alcool. On essore, on lave les cristaux avec de l'alcool et de l'éther et on sèche jusqu'à poids constant sur chlorure de calcium, puis sur acide sulfurique dans le vide. On obtient 0 gr. 50 de poudre cristalline blanche de formule $C^6H^9O^7K + 1,5H^2O$. Le pouvoir rotatoire spécifique en solution aqueuse est de: $[\alpha]_D^{21} = +20^{\circ}02$ au bout d'une heure et demie. Pour le sel anhydre: $[\alpha]_D^{21,5} = +22^{\circ}47$ (final).

GLYCURONATE D'AMMONIUM: 0 gr. 29 d'acide glycuronique cristallisé sont dissous dans 15 cc. d'alcool à 90° et presque complètement neutralisés avec une solution aqueuse d'ammoniaque déci-normale. Le liquide encore faiblement acide est évaporé dans le vide sur chlorure de calcium. On sépare d'abord des précipitations amorphes, puis quand le liquide a atteint le volume de 10 cc., on ajoute quelques gouttes d'alcool au liquide clair. On frotte les parois du vase avec une baguette de verre, il se produit bientôt un trouble amorphe qui se transformera en un précipité cristallin par addition d'alcool. On continue comme précédemment. On obtient de fines aiguilles de formule: $C^6H^9O^7(NH^4)$ — avec $[\alpha]_D^{20} = +23^{\circ}17$ (final au bout d'une heure et demie) en solution aqueuse.

GLYCURONATE DE BARYUM: Obtenu par neutralisation incomplète d'une solution alcoolique d'acide cristallisé (1 p. 50 environ) par de l'eau de baryte décinormale. Sel blanc qu'il a été impossible d'obtenir à l'état cristallisé. Soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool. Ne présente pas de mutarotation. $C^{12}H^{18}O^{14}Ba$ $[\alpha]_D^{20,5} = +17^{\circ}45$. Nous avons vu l'importance de ce corps,

produit intermédiaire dans la préparation de l'acide glyceuronique.

En plus de ces sels minéraux, certains sels organiques ont été préparés, en particulier des sels d'alcaloïdes, qui sont importants, car ils servent de moyen de caractérisation de l'acide glycuronique en chimie végétale. Leur mode de préparation et la détermination de leur constante physique ont donné lieu à un certain nombre de travaux.

SEL DE QUININE: $C^6H^{10}O^7$, $C^{20}H^{24}N^2O^2$ fut préparé pour la première fois par Neuberg [193]. Le point de fusion est de $+18^\circ$. le pouvoir rotatoire spécifique: $[\alpha]_D = -80^\circ 1$. Peu utilisé, on lui préfère les dérivés suivants:

SEL DE CINCHONINE: $C^6H^{10}O^7$, $C^{19}H^{22}N^2O$, cette substance qui cristallise très bien a été obtenue par Neuberg [193]. Cet auteur a trouvé les constantes physiques suivantes: Point de fusion: $+204^\circ$; $[\alpha]_D = +138^\circ 6$. Ehrlich et Rehorst [59] le préparèrent par simple dissolution de la Cinchonine solide dans une solution aqueuse d'acide glycuronique pure et à chaud. On recristallise plusieurs fois dans l'eau. On décolore au besoin par un peu de noir animal. On obtient des cristaux en forme de fines aiguilles blanches qui fondent à 199° - 200° et qui présentent un pouvoir rotatoire spécifique en solution aqueuse: $[\alpha]_D^{24} = +135^\circ$.

SEL DE BRUCINE : $C^6H^{10}O^7$, $C^{23}H^{26}N^2O^4 + H^2O$ préparé également par Neuberg [193], qui lui assigne un point de fusion de 200° , à partir de la lactone. A été ensuite

obtenue par Ehrlich et Rehorst [60] de la façon suivante: On dissout 0 gr. 60 d'acide glycuronide cristallisé dans 25 cc. d'eau environ, on ajoute 1 gr. 50 de brucine et on chauffe pendant une demi-heure au bain-marie. Après refroidissement on filtre pour éliminer la brucine non combinée, et le produit de la réaction est repris par du chloroforme, puis évaporé dans un exsiccateur à acide sulfurique dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. Ce sirop est broyé avec de l'alcool à 93°. Si l'on ajoute alors quelques gouttes d'éther on voit apparaître un trouble. On frotte alors les parois du vase avec une baguette de verre pour amorcer la cristallisation qui bientôt est totale. Les cristaux sont délayés avec de l'alcool, essorés et lavés avec de l'éther et de l'alcool, et séchés dans une cloche à vide sur acide sulfurique. Le sel ainsi obtenu contient d'après l'analyse une molécule d'eau que l'on ne peut pas chasser. Il se présente sous forme d'aiguilles beaucoup plus fines que celles du sel de cinchonine, qui fondent à 156°-157°. Leur pouvoir rotatoire spécifique est de $[\alpha]_D^{20} = -15.08$. Ils ne présentent pas de mutarotation.

B. — ETHERS-SELS

Nous avons vu qu'au cours de l'hydrolyse du bornylglycuronide par des acides minéraux dilués, il se forme du bornéolglycuronate de bornyle [255] qui résulte de l'éthérification de la fonction acide de cet uronide par

le groupement alcoolique du bornéol. C'est un corps insoluble dans l'eau, mais très soluble dans l'alcool, l'éther, l'éther de pétrole, l'acétone, le benzène, le toluène et l'acide acétique. Son point de fusion est de: 96°-97° (non corrigé).

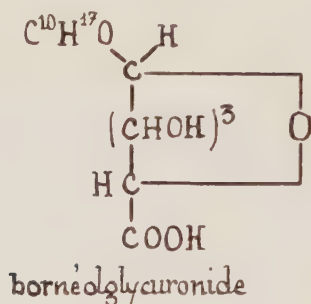
Les conjugués glycuroniques (Glycuronides)

On sait que c'est par l'étude de ces composés qu'a débuté l'histoire de l'acide glycuronique. Nous avons vu précédemment comment on pouvait envisager leur constitution chimique. Parmi les nombreuses substances qui sont susceptibles d'être éliminées par l'organisme sous forme de glycuronides, assez peu ont pu être obtenus dans un état de pureté suffisante, pour pouvoir étudier leurs propriétés chimiques et fixer leur constitution exacte. Aussi existe-t-il encore à ce sujet une certaine imprécision. Ces corps sont cependant importants à connaître, car il semble que c'est uniquement sous cette forme que l'acide glycuronique se trouve présent dans l'organisme de l'homme et des animaux.

I. – Classification

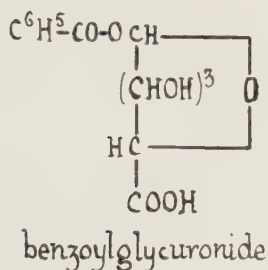
Après Pryde et Williams [215] nous classerons les conjugués glycuroniques en trois groupes distincts. Cette classification n'est évidemment pas rigoureuse, mais elle résume assez bien, nous semble-t-il, les faits actuellement connus.

I. — Les conjugués glycuroniques du type glucosidique *liaison éther-oxyde* tel que le bornyl glycuronide, dans lequel le résidu non sucré est fixé au groupe réducteur de l'acide glycuronique par le moyen d'une liaison glucosidique vraie.



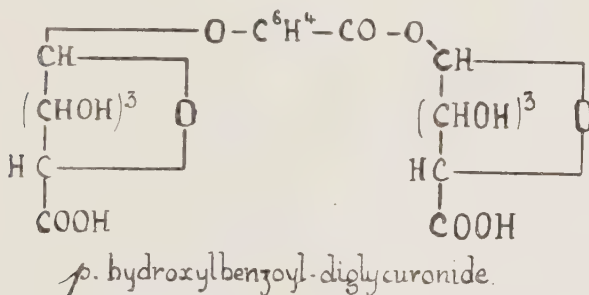
C'est ce groupe qui contient de beaucoup le plus grand nombre de conjugués. Les acides phénol, menthol, camphoglycuroniques, etc... en font partie. Les glycuronides de ce type ne sont pas en général réducteurs.

II. — Les conjugués glycuroniques possèdent une *liaison éther-sel*. On peut citer comme exemple le benzoylglycuronide, dans lequel le radical benzoyle est fixé au carbone réducteur de l'acide uronique. Cette liaison est instable en présence des agents hydrolytiques les plus faibles et ces glycuronides sont réducteurs. On peut les représenter par la formule suivante, en prenant pour type le dérivé benzoïque:



Un certain nombre de composés, principalement des dérivés de l'acide benzoïque, figurent dans cette classe.

III. — Enfin, un *troisième* groupe est constitué par les acides glycuroniques conjugués contenant deux molécules d'acide glycuronique: l'un fixé au résidu aglycone par une union glucosidique type éther-oxyde comme dans le groupe I, et l'autre unie par une liaison éther-sel, comme dans le groupe II; le seul glycuronide connu actuellement est l'acide parahydroxybenzoyle diglycuronique décrit par Quick [222].



II. — Méthodes de préparation

Nous allons tout d'abord indiquer sommairement le principe des deux méthodes générales dont se sont servis les auteurs qui ont étudié la glycuconjugaison. (Hoppe, Seyler [112]; Fredoux [70].

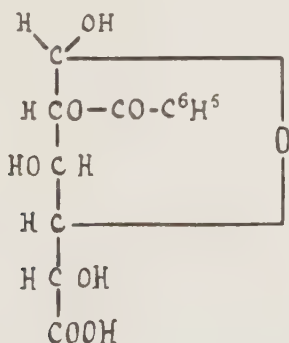
Ces deux techniques d'isolement reposent sur la précipitation des glycuronides par le sous acétate de plomb ou, mieux, par le sous acétate de plomb ammoniacal. Ce qui les différencie, c'est le traitement auquel on soumet l'urine avant l'action du réactif précipitant. Le traitement a pour but d'isoler le corps cherché des substances étrangères. Dans la première méthode on épuise l'urine plus ou moins concentrée par un mélange d'alcool et d'éther dans lequel le glycuronide est soluble. (Külz [145], Neuberg et Lachmann [188]. Dans la seconde, on purifie l'urine par traitements successifs par l'eau de baryte, le chlorure de baryum et l'acétate neutre de plomb (P. Mayer [171].

Nous avons étudié en détail la technique de préparation du bornylglycuronide, nous allons simplement résumer ici la méthode d'obtention du benzoïlglycuronide et du parahydroxybenzoïldiglycuronide types des deuxième et troisième groupes.

La meilleure méthode pour l'obtention du conjugué benzoïque est celle de Quick [223], modifiée par Pryde et Williams [215]. On utilise des chiens. L'urine est purifiée par défécation à l'acétate neutre de plomb,

puis précipitée par l'acétate basique à un pH déterminé. Le sel de plomb est décomposé par l'hydrogène sulfuré. L'acide hippurique est précipité en partie par la concentration de la solution, puis est éliminé par le chloroforme, puis par l'éther. On dissout enfin la masse dans l'alcool méthylique et on précipite par l'éther anhydre. Cette préparation est très délicate, les opérations demandent à être conduites avec grand soin, à la température de la glace fondante, les réactifs eux-mêmes doivent être refroidis à la glacière, où s'effectuent toutes les cristallisations.

Si l'opération a réussi, on obtient ainsi une poudre cristalline constituée par des agrégats d'aiguilles courtes, épaisses, disposées souvent en rosaces. Cet uro-nide est soluble dans l'alcool méthylique et éthylique, dans l'eau, légèrement soluble dans l'acétate d'éthyle, et insoluble dans l'éther et le chloroforme. Son point de fusion est de: $+183^{\circ}$ (Quick indique 171°). Son pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -25^{\circ}3$. Quick [223] lui attribuait la formule suivante:



Ce résultat était important, car il infirmait la théorie de Fischer et Piloty, relative au mécanisme de la production des glycuronides, aussi demandait-il à être vérifié.

Les données analytiques de cet auteur furent trouvées insuffisantes par Pryde et Williams qui entreprirent l'étude de la constitution de cet uronide et donnèrent la formule que nous avons indiquée plus haut. Ils purent, en particulier, obtenir une cyanhydrine avec libération simultanée d'acide benzoïque, l'alcalinité du cyanure ayant suffi pour provoquer le dédoublement.

Le parahydroxybenzoyldiglycuronide a été obtenu par Quick [222]. L'urine de chien, déféquée au plomb, est soumise à l'extraction par l'alcool butylique. Le produit cristallise lors de l'évaporation des solutions alcooliques. On recristallise plusieurs fois dans l'eau chaude, on purifie par l'éther. On obtient un produit cristallisé, rapidement soluble dans l'eau chaude, faiblement dans l'eau froide, 1 % environ à 20°. Point de fusion au-dessus de 200° avec décomposition. Pouvoir rotatoire en solution à 1 % $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ à -16° . Présente les propriétés respectives des deux types de conjugués.

III. - Propriétés générales

Les glycuronides présentent des propriétés un peu analogues à celles des glucosides. Car eux-mêmes ils sont dédoublés par hydrolyse minérale ou fermentaire

en acide uronique et aglycone. Ce sont en général des isomères β . Ces β uronides, qui sont tous naturels, ont la propriété de dévier à gauche le plan de la lumière polarisée. Au contraire, nous avons vu que les α uronides (ceux qui ont été préparés artificiellement) sont caractérisés par une forte déviation dextrogyre; la réduction de la liqueur de Fehling est variable suivant les cas, mais il s'agit plutôt d'une question de temps, le dédoublement s'effectuant peu à peu. L'hydrolyse des β uronides libère les deux constituants, si l'aglycone est inactif ou dextrogyre ou bien s'il a un pouvoir rotatoire lévogyre numériquement inférieur à celui de l'acide glycuronique, le sens de la rotation des solutions après hydrolyse aura changé. De plus, la réduction de la liqueur cupropotassique sera immédiate à l'ébullition. L'acide glycuronique ainsi mis en liberté présentera les propriétés chimiques et les réactions colorées habituelles. La fonction carboxyle étant libre, les glycuronides sont donc des acides et tels ils donnent facilement des sels. Les sels de plomb sont presque tous insolubles, les sels alcalins et surtout les sels d'alcaloïdes cristallisent bien. Ces conjugués presque tous solubles dans l'eau, un grand nombre sont solubles dans les solvants organiques. Ils ne précipitent pas par le nitrate mercurique (réactif de Patein).

Pendant longtemps on a cru que les glycuronides étaient l'apanage exclusif du régime animal, mais nous verrons qu'ils sont également présents dans le règne végétal. Les hypothèses que l'on fait sur le lieu et le mécanisme de leur formation chez l'homme et les

animaux seront indiquées plus loin. Nous dirons ici un mot sur les tentatives de préparations synthétiques. On sait que Neuberg et Neimann [197] réalisèrent la synthèse d'un glycuronide, l'acide phénylglycuronique par action du phénol potassé sur l'acide diacétylbromoglycuronique. Récemment Gœbel et Babers [79] ont tenté, mais sans succès, de reproduire les expériences des auteurs allemands. Ils ont préparé et étudié la triacétylglycurone. Quelques mois plus tard [89], ils réussirent à préparer la diacétylchloroglycurone au moyen de laquelle ils poursuivent actuellement l'étude de cette synthèse.

Les substances susceptibles de s'éliminer sous forme de conjugués glycuroniques appartiennent aux séries les plus diverses de la chimie organique. Parmi les corps de la série grasse on y trouve des alcools primaires, secondaires et tertiaires, des aldéhydes halogénés ou non, des cétones, des carbures. Les substances aromatiques fournissent des carbures, des phénols, et leurs dérivés, des aldéhydes, des cétones, des acides, des amines; la série hydroaromatique, des carbures, des alcools, des cétones, les aldéhydes terpéniques ou sesquiterpéniques. On y rencontre des corps hétérocycliques: pipéridiques, indoliques, quinoléiques, xanthoniques, pyrazoliques. Enfin, les éléments complets tels que les alcaloïdes. On trouvera l'énumération de ces substances, ainsi que les transformations subies par elles dans l'organisme pour être rendues aptes à la conjugaison glycuronique, dans les ouvrages suivants:

Huppert [116]: Analyse des Harns; Neuberg [198]: Der Harn; dans la thèse de Frédoux [70]; en outre, on trouvera l'étude d'un certain nombre de glycuronides dans le Dictionnaire de Wurtz [291]. Enfin, pour les conjugués découverts plus récemment, on pourra s'adresser au Dictionnaire d'Abderhalden [3].

DEUXIÈME PARTIE

Les méthodes de recherche et de dosage

Examen qualitatif

Lorsqu'on a affaire à des solutions pures d'acide glycuronique conjugué ou tout au moins exemptes de pentoses ou de substances réductrices, on peut le mettre en évidence par l'ensemble de ses propriétés chimiques, en particulier par la manifestation de son pouvoir réducteur après hydrolyse, la déviation polarimétrique lévogyre de la solution qui devient dextrogyre après complet dédoublement, son isolement à l'état de sel de plomb, d'argent, ou à l'état de sel d'alcaloïdes, les combinaisons hydraziniques ou ses multiples réactions colorées.

Mais, en pratique, on a presque toujours à rechercher ce corps en chimie biologique, dans des milieux complexes comme l'urine par exemple. Dans ce cas, trois méthodes sont plus sûres : la réaction colorée avec la naphtorésorcine, et la combinaison avec la parabromophénylhydrazine et la phénylhydrazine.

I. — REACTION COLOREE AVEC LA NAPHTORESORCINE

B. Tollens et Rorive [278] ont signalé, en 1908, une nouvelle réaction colorée des sucres obtenue par condensation de ceux-ci avec la naphtorésorcine ou

1-3 dioxynaphtaline. Il se forme des produits colorés insolubles dans l'eau, solubles dans l'alcool et présentant un spectre d'absorption caractéristique. Quelques parcelles de sucre à examiner sont mélangées avec une quantité égale de naphtorésorcine et 10 cc. d'un mélange à parties égales d'eau et d'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,19$). Le liquide est chauffé doucement, puis maintenu à ébullition de une à trois minutes. La liqueur est ensuite refroidie, filtrée et le précipité est lavé puis dissous dans l'alcool éthylique. On obtient ainsi des liquides très colorés et possédant une fluorescence verte très prononcée. Ces colorations sont variables suivant les sucres : arabinose, xylose, rhamnose, fucose, galactose, fructose, sorbose, etc... Le *d* glucose, le mannose et les holosides et les polyholosides qui donnent du *d* glucose, à l'hydrolyse montrent une bande spectrale dans le vert et une faible coloration rouge. L'acide glycuronique donne une solution bleue montrant une bande sur la raie D du spectre, les conjugués se comportent de même.

La même année, B. Tollens [279] remarqua que le précipité obtenu par l'action de la naphtorésorcine sur l'acide glycuronique ou ses dérivés en présence d'acide chlorhydrique est soluble dans l'éther, tandis que celui produit par les sucres ne l'est pas. Ce solvant devient bleu ou violet et montre une bande d'absorption très nette sur la raie D. En présence de pentoses la couleur est violette rouge, mais la position de la bande reste invariable. Les sucres seuls donnent simplement une solution éthérée faiblement jaune sans

bande d'absorption. De plus cette réaction est sensible, une coloration très nette se développe quand le liquide acide contient seulement 0,1 % de lactone glycuronique et est enfin applicable à l'urine.

L'étude de l'application aux milieux biologiques fut entreprise par C. Tollens [280]. Il substitua à l'emploi de la naphthorésorcine en nature, sa solution alcoolique. Voici sa technique, qui a servi de base à toutes les autres :

Dans un tube à essai, on introduit 5 cc. d'urine ou du liquide à étudier, 0,5 à 1 cc. d'une solution alcoolique de naphthorésorcine à 1 % et un volume d'acide chlorhydrique concentré ($D = 1,19$) égal à celui du liquide déjà contenu dans le tube. On chauffe à l'ébullition, on laisse bouillir pendant une minute, on met le tube de côté, et après quatre minutes on le refroidit sous un courant d'eau ; on y verse un volume d'éther égal à celui du liquide, on agite fortement, et après séparation des liquides on procède à l'examen au spectroscope.

En présence de l'acide glycuronique ou de ses conjugués, l'éther se trouve coloré en bleu violet. Au spectroscope, on aperçoit une bande d'absorption sur la raie D, mais il ne faut pas avoir une coloration trop intense. Le liquide aqueux présente en général une fluorescence verte. C. Tollens [281] propose d'ajouter une minute après l'agitation à l'éther 0,5 cc. d'alcool à 95°. La sensibilité de la réaction serait de l'ordre de cinq dixièmes de milligramme à 1 milligramme d'acide glycuronique.

Cette technique était donc plus simple et plus cer-

taine que les méthodes habituelles et elle permettait d'effectuer la recherche de cet acide uronique en présence de pentoses. Il semblait que l'on avait en mains une réaction permettant de caractériser avec certitude l'acide glycuronique. Aussi cette méthode, dès son apparition, a-t-elle suscité de nombreux travaux, qui n'ont malheureusement pas abouti encore à la solution du problème. Pour les exposer il serait fastidieux de suivre l'ordre chronologique, nous allons essayer, pour plus de clarté, d'établir une sorte de classification de ces recherches. Elles ont eu pour but principal l'étude de la spécificité de cette réaction colorée et la mise au point de procédés permettant de reconnaître et d'éliminer les causes perturbatrices. On peut envisager d'une façon schématique, d'abord les modifications apportées aux divers types de la technique primitive et ensuite l'application aux liquides biologiques.

A. — MODIFICATIONS DIVERSES DE LA TECHNIQUE.

Ces modifications sont très nombreuses et ont porté tour à tour sur le réactif lui-même, l'acide utilisé, le solvant, le temps de chauffe, etc...

B. Tollens et Rorive [278] eux-mêmes avaient remarqué que si la présence d'acides lactique et saccharique ne constitue pas une cause d'erreur, par contre la formaldéhyde donne un précipité colloïdal qui noircit rapidement. A. Jolles [131], étudiant la méthode à la naphthorésorcine constate que cette réaction, qu'il a pu obtenir avec des solutions contenant

0 gr. 0006 % d'acide glycuronique, n'est pas perturbée par la présence de pentoses, ni d'autres sucres, excepté le glucose en grandes quantités. L'acide gluconique cependant donne une coloration en solution à partir de 0,1 %. L'acétaldéhyde et l'acide formique gênent la réaction. De sérieuses réserves ont été formulées par Mandel et Neuberg [172] quant à la spécificité de cette réaction. Ils ont démontré que tous les acides aldéhydes et cétoniques polyhydroxylés produisent un colorant identique à celui de l'acide glycuronique, c'est-à-dire soluble dans l'éther. D'après ces deux auteurs il faut considérer cette réaction comme liée à la présence simultanée d'un groupement carbonyle $C=O$ ou aldéhydique $H-C=O$ et d'une fonction acide. Ils ont même pu obtenir la coloration violette caractéristique avec le représentant le plus simple de ces acides aldéhydes, l'acide glyoxylique, ce dernier fait a été confirmé plus tard par Bergmann et Wolff [15].

C'est en effet une réaction des acides uroniques, l'acide galacturonique et d'autres isomères la donnent aussi.

Neuberg [199], dans une nouvelle étude de cette technique, signale que le réactif s'altère à la lumière, aussi il est préférable de le conserver dans l'obscurité et d'employer la naphtorésorcine en nature plutôt que sa solution alcoolique, de plus il est impressionné par le glucose et les aldéhydes formique et acétique. Deux auteurs japonais, Asahina et Hasegawa [4] recommandent d'utiliser l'acide monocarbonique dérivé de la naphtorésorcine, c'est-à-dire l'acide 1-3 dioxynaphthalène 2 carbonique, dont ils emploient le sel de

baryum. Ils préparent l'acide libre extemporanément au moyen de l'acide chlorhydrique ajouté dans la réaction de Tollens. Ogata et Yamanouchi [209] ont également signalé les bons résultats qu'ils ont obtenus avec une solution fraîchement préparée de cet acide. Ce nouveau réactif n'a pas été utilisé en France où l'on se sert du dérivé dihydroxylé de Tollens, mais il est important d'avoir l'isomère 1-3. Chiray et Thiébaud [43] indiquent que ce produit qui venait d'Allemagne s'est trouvé supprimé depuis la guerre et que les maisons françaises n'avaient pas cru devoir au début s'intéresser à sa fabrication, la naphtoré-sorcine de provenance suisse donnerait en général des réactions nulles ou inconstantes. Nous avons néanmoins pu obtenir avec un produit de cette provenance de très belles colorations.

Au point de vue de l'acide utilisé, il faut signaler les recherches récentes de Neuberg et Kobel [190]. Après avoir étudié l'action perturbatrice de nombreux sucres, ils recommandent d'utiliser l'acide sulfurique au lieu de l'acide chlorhydrique et à la concentration de 50 %.

De nombreux essais ont été faits en utilisant des solvants variés. Bernier [18], le premier, avait déjà substitué à l'éther d'autres dissolvants tels que le chloroforme, la benzine. Avec le sulfure de carbone il indique que la matière colorante ne s'y dissout pas et avec l'alcool amylique on obtient une solution bleue virant presque aussitôt au rouge foncé, puis au brun. Neuberg et Saneyoshi [200] recommandent l'extraction au benzène, la réaction serait ainsi beau-

coup plus spécifique. W. Van der Haar [115] confirme ce résultat et en employant la technique des osazones, que nous verrons plus loin, il a pu obtenir la réaction caractéristique en présence d'arabinose, de xylose, de rhamnose, de glucose, de fructose, de mannose et de galactose. Neuberg et Kobel [190], dans leur récent mémoire, montrent nettement que l'extraction à l'éther n'est pas spécifique en présence de sucres, ils recommandent le benzène ou mieux le chloroforme.

Quant à la question du temps de chauffage, elle a donné lieu à diverses recherches. Nous avons vu que Tollens chauffe le liquide à l'ébullition pendant une minute (il recommande même de faire bouillir avec grande précaution) ; ce temps a d'ailleurs été respecté par les auteurs allemands. En France, Grimbert [90] et Bernier [24], dans leur technique au mercure, recommandent de chauffer pendant dix minutes à un quart d'heure au bain-marie bouillant. Roger [239] indique également un quart d'heure ; d'autres auteurs quarante minutes. Caille [44] signale qu'il a obtenu des colorations d'autant plus rouges que la température de chauffe avec la naphthorésorcine a été plus élevée. La réaction n'est franchement violette qu'à des températures voisines de 100 degrés, le furfurol formé à température élevée doit jouer un rôle. Brulé [25] et ses collaborateurs insistent sur l'extrême diversité des teintes obtenues variant du violet au rouge grenat, mais si on ne met la naphthorésorcine que pendant les trois dernières minutes des quinze minutes de l'ébullition, la teinte est toujours violette. Ces auteurs attribuent la modification de la

couleur à la fragilité spéciale de l'acide glycuronique éliminé dans certains cas pathologiques. Poursuivant ces recherches avec Amer [5], Brulé est arrivé à la conclusion que par la technique de chauffage prolongé appliquée à certaines urines pathologiques, la naphthorésorcine subissait une destruction partielle ou une absorption par des substances inconnues favorisée par la haute température. Neuberg [198] avait déjà montré que les hydrates de carbone qui réagissent avec la naphthorésorcine pouvaient fixer tout le réactif et empêcher par là la réaction avec l'acide glycuronique de se manifester ; aussi employait-il un grand excès de dioxynaphtalène. Avec Kobel [190] il indique qu'une des causes principales des insuccès provient du chauffage trop prolongé et de l'emploi d'un acide chlorhydrique trop fort.

B. — APPLICATION AUX LIQUIDES BIOLOGIQUES.

Nous envisagerons d'abord l'application aux urines. Nous avons vu que C. Tollens pratiquait la réaction directement sur ce liquide, mais de bonne heure, des chercheurs s'aperçurent que de nombreuses substances étaient susceptibles d'empêcher ou de modifier la coloration. Ces corps se trouvent dans les urines normales, mais surtout dans certaines urines pathologiques, d'où la nécessité qui s'est imposée de les éliminer. Deux grands groupes de procédés ont tour à tour été employés dans ce but. Dans l'un on tente de faire disparaître les substances nuisibles par une défécation du liquide, tandis que dans l'autre on cherche

à isoler les glycuronides soit sous forme de combinaisons insolubles, soit en utilisant leurs solubilités dans certains solvants organiques.

1° DÉFÉCATION. — Le premier groupe de procédés est représenté par la méthode de Grimberty et Bernier [24, 90, 18], dite méthode au *mercure*. Bernier avait remarqué que si on pratique sur une urine la réaction de Tollens, mais sans naphthorésorcine, la solution éthérée se colore en bleu grâce à l'indigotine qu'elle a dissoute et présente une raie voisine de celle observée avec la dioxynaphtaline. Le résultat est identique en employant le chloroforme au lieu de l'éther. Il est donc de toute nécessité d'éliminer l'indoxyle, ce qui peut se réaliser par une défécation au moyen d'une solution saturée d'acétate de mercure.

Pour cela, 50 cc. d'urine fraîche sont additionnés de 25 cc. d'une solution saturée à froid d'acétate mercurique et le précipité qui se forme est séparé par filtration. A 5 cc. de liquide filtré on ajoute 0 cc. 5 d'une solution alcoolique de naphthorésorcine à 1 % et 5 cc. d'acide chlorhydrique pur. On chauffe au bain-marie bouillant dix minutes. Le tube est ensuite refroidi sous un courant d'eau. On y verse un volume d'éther égal à celui du liquide et on agite vivement. Ce solvant se sépare coloré en bleu violacé.

Il ne paraît pas nécessaire d'éliminer le mercure par la poudre de zinc après neutralisation. Il est inutile d'opérer une hydrolyse préalable, l'acide chlorhydrique produit un dédoublement partiel ou total des conjugués.

2° ISOLEMENT DES CONJUGUÉS. — Plusieurs techniques peuvent être rangées dans ce deuxième groupe de méthodes. L'une des plus utilisées est celle de Roger [239] ou *méthode au plomb* ; elle consiste à insolubiliser les glycuronides sous forme de leurs sels de plomb.

Si l'on traite par le procédé au mercure les urines d'individus malades, l'éther est fréquemment coloré non plus en violet, mais en rouge, en rose, en jaune. Roger pense que ces variations de la réaction colorée sont dues en partie à une augmentation de diverses substances capables d'entraver la réaction. Ce sont plutôt des corps réducteurs qui remplissent ce rôle antagoniste, le glucose en particulier. Ceci se rencontre au plus haut point dans des urines de diabétiques. Jolles [132] avait déjà remarqué que dans ces urines le glucose gêne beaucoup la recherche ; aussi recommandait-il la technique suivante : 200 à 400 cc. d'urine sont complètement précipités par le sous-acétate de plomb et filtrés. Le précipité obtenu est lavé à quatre reprises avec de l'eau et décomposé par l'hydrogène sulfuré. Le filtrat est concentré à 20 cc. et c'est sur ce liquide qu'on pratique la réaction à la naphtorésorcine. Le procédé de Roger [239] et Caille [44] est encore plus simple ; il utilise le sous-acétate de plomb ammoniacal.

Dans le tube d'un centrifugeur, on verse 5 cc. de l'urine à examiner. On ajoute 0 cc. 2 d'ammoniaque, puis 2 cc. de la solution de sous-acétate de plomb (extrait de Saturne). Il se fait un abondant précipité qui renferme la totalité de l'acide glycuronique. On

remplit le tube avec de l'eau distillée contenant 1 % d'ammoniaque. On centrifuge, on décante et on lave à deux reprises avec de l'eau ammoniacale. Le précipité est délayé dans 5 cc. d'eau distillée et la bouillie blanche ainsi obtenue est versée dans un tube à essai. On pratique alors la réaction comme dans la méthode au mercure. Il faut éviter que les tubes ne touchent les parois du bain-marie, il y aurait surchauffe locale et ensuite altération de la coloration violette finale. Le temps de chauffe est de un quart d'heure environ.

W. Van der Haar [117]. a appliqué un principe analogue à la recherche dans les produits végétaux : la substance est hydrolysée par l'acide sulfurique à 5 %, le mélange est ensuite neutralisé par de la baryte et concentré après filtration. Le filtrat est déféqué par l'acétate neutre de plomb, puis précipité par l'acétate basique. Pour faire la réaction l'auteur emploie l'acide chlorhydrique à 10 %, de la naphthorésorcine en nature, et le benzène comme solvant. Le temps de chauffe est de une minute.

Ces deux procédés de Grimberty et Bernier et de Roger ont été étudiés par Brulé et ses collaborateurs. Ils pensent que ces deux méthodes ne représentent pas des moyens sûrs et fidèles de détection de l'acide glycuronique dans les urines pathologiques et en particulier provenant de sujets atteints d'affections hépatiques. Dans ces urines existent des substances encore indéterminées qui détruisent la naphthorésorcine quand l'ébullition avec l'urine est prolongée. Si l'on raccourcit le temps de chauffe ou si l'on réajoute de la naphthorésorcine, la réaction peut devenir positive.

Les déféquants au mercure ou au plomb n'éliminent qu'une partie des substances nuisibles, même en les utilisant simultanément. Outre l'indol et le scatol, ces auteurs ont confirmé l'action perturbatrice du formol, déjà signalée, provenant par exemple de l'ingestion d'urotropine [26].

Nous allons maintenant envisager d'autres procédés qui semblent plus sûrs mais qui, malheureusement, n'ont pas été très souvent appliqués à notre connaissance à l'étude d'urines pathologiques.

Au lieu d'isoler les conjugués glycuroniques sous forme de sels de plomb, on peut aussi les hydrolyser et transformer l'acide à l'état d'osazone. Cette façon d'opérer, déjà essayée par Bernier [18] fut reprise par Neuberg et Saneyoshi [200] et W. van der Haar [115] en fit une étude critique : 10 centigrammes environ d'osazone sont dissous dans 4 cc. d'acide chlorhydrique ($D=1,19$). On ajoute 4 cc. d'eau et on chauffe quelques minutes. On ajoute 10 centigrammes de naphtorésorcine et on chauffe encore à l'ébullition une demi-minute. On refroidit à 50° et on ajoute le benzène. On obtient une belle coloration violette. Ce dernier auteur conclut que la réaction à la naphtorésorcine, suivant Neuberg et Saneyoshi, est sensible et spécifique de l'acide glycuronique et des autres acides aldo et céto uroniques.

Neuberg et Schewket [201] remarquent que les produits divers qui dans l'urine normale donnent la réaction de l'acide glycuronique sont insolubles dans l'éther. On peut donc rechercher cet acide avec plus de certitude dans l'extrait éthéré de l'urine. Pour

cela on prend 10 cc. d'urine, on ajoute 2 cc. d'acide sulfurique dilué, puis 10 cc. d'alcool et 20 cc. d'éther. Après agitation, la couche éthérée est séparée, lavée et évaporée. On recherche sur le résidu l'acide glycuronique par la réaction à la naphtorésorcine. Schewket [261] a appliqué cette méthode à la recherche de l'acide glycuronique dans l'urine des diabétiques. L'urine acidulée par l'acide sulfurique ou phosphorique dilués est extraite comme plus haut. La liqueur éthérée est évaporée au bain-marie en présence de 5 cc. d'eau, c'est sur le résidu aqueux qu'on effectue la réaction colorée. Ce procédé applicable aux cas de glycosurie ou de pentosurie est supérieur au procédé au plomb de Jolles. Il convient comme d'ailleurs pour toutes les réactions précédentes, d'opérer sur l'urine fraîche, afin d'éviter le dédoublement du conjugué, celui-ci seul est en effet soluble dans l'éther.

Neuberg et Kobel [190], dans un article récent, ont fait une étude générale de la réaction des acides aldoniques avec la naphtorésorcine. En utilisant des acides variés à concentrations différentes, avec des solvants également différents, en faisant varier la durée de chauffe, la quantité d'acide uronique et en étudiant l'influence d'un grand nombre de substances perturbatrices, ils ont été amenés à proposer une nouvelle technique qui leur a paru nettement supérieure. En employant leur procédé, l'action perturbatrice des sucres est évitée, même lorsque le glucose, le galactose, le mannose, le xylose, l'arabinose, le maltose et le lactose sont présents dans le rapport de 200 à 1

d'acide uronique ; le fructose dans le rapport de 30 à 1 d'acide glycuronique ; le saccharose dans le rapport de 50 à 1 d'acide uronique. L'application à l'urine est la suivante : 3 cc. d'urine fraîche sont additionnés de 3 cc. d'acide sulfurique à 50 % et de 0 gr. 10 de naphtorésorcine, on porte deux minutes au bain-marie bouillant, on laisse refroidir et on extrait par 2 cc. de chloroforme pur. Celui-ci prend une belle coloration violette et montre le spectre caractéristique. (Il serait préférable de déféquer tout d'abord par l'acétate de mercure.)

Au sujet de l'application au sang, nous dirons que Stepp [262] avait étudié la présence de l'acide glycuronique dans ce liquide à l'aide de réactions qui s'étaient révélées positives. Diebschlag [149] effectue la réaction à la naphtorésorcine et remarque l'action perturbatrice exercée par des substances présentes dans le sang, qui viennent fausser les réactions. En collaboration avec Stepp [263], il discute la valeur des méthodes qualitatives. Cette recherche s'effectue généralement après désalbumination du sang par l'acide phosphotungstique.

Il semble bien en définitive que l'on doive faire *une distinction très nette* au sujet de la valeur de la réaction à la naphtorésorcine suivant qu'elle est appliquée à des recherches de chimie analytique générale et de chimie végétale, ou suivant qu'elle est réservée à l'étude des milieux complexes comme les urines et le sang. Dans le premier cas, elle peut être considérée comme une réaction assez caractéristique et spécifique des acides uroniques, surtout d'après la technique de

Neuberg et Kobel. Dans le deuxième cas, au contraire, elle ne permet pas de détecter d'une façon sûre et constante l'acide glycuronique présent dans beaucoup d'urines pathologiques, surtout par les méthodes au plomb et au mercure. Cependant elle constitue une bonne réaction pour la plupart des urines normales.

VI — COMBINAISONS PARABROMOPHENYLHYDRAZINIQUES

Nous abordons ici avec les combinaisons hydraziniques une des parties les plus complexes de l'histoire de l'acide glycuronique. Nous nous contenterons de noter les faits qui semblent définitivement acquis.

Considérons d'abord les combinaisons qui pourraient se former *théoriquement* avec la parabromophénylhydrazine, ce raisonnement étant évidemment valable pour la phénylhydrazine. L'acide glycuronique peut réagir avec les hydrazines aromatiques à la fois par sa fonction aldéhydique et par son carboxyle acide, simultanément ou successivement. Nous aurons au moins les dérivés suivants : l'hydrazone de l'acide glycuronique, l'hydrazone d'un glycuronate : baryum, sodium, etc..., l'hydrazone du glycuronate de parabromophénylhydrazine (sel par addition), l'hydrazine hydrazone ; pour les combinaisons du type osazone, les mêmes dérivés peuvent se retrouver comme la parabromophénylosazone du méthyl-glycuronate de parabromophénylhydrazine qui contient trois molécules d'hydrazine de formule $C^{25}H^{27}O^5N^6Br^3$, obtenue par Le-

vène et Meyer [150]. Ceci peut encore se compliquer par la préparation de certaines de ces combinaisons avec la lactone et non pas l'acide. La plupart de ces dérivés ont été obtenus, une étude détaillée en a été faite récemment, avec les acides galacturonique et mannuronique [187].

C'est Neuberg [193] qui, le premier, en 1899, réussit à préparer une combinaison parabromophénylhydrazinique de l'acide glycuronique, qu'il signala comme étant caractéristique de ce corps. Il opérait de la façon suivante :

« On ajoute à 250 cc. d'une solution aqueuse d'acide glycuronique pur renfermant environ 2 grammes (calculés en anhydride d'après la déviation polarimétrique) 5 grammes de chlorhydrate de parabromophénylhydrazine et 6 grammes d'acétate de sodium. On porte à l'ébullition ; le liquide se trouble d'abord, mais redevient clair au bain-marie. Après cinq à dix minutes, il commence à précipiter des aiguilles jaune clair. On retire du bain-marie et, par refroidissement, on obtient un abondant dépôt cristallin ; on essore et le filtrat est chauffé à nouveau. On obtient après plusieurs opérations, la presque totalité de l'acide glycuronique à l'état de combinaison. »

Cette combinaison pour laquelle Neuberg admet la formule brute $C^{12}H^{17}O^7N^2Br$, se présente au microscope sous la forme de houpettes très fragiles, se désagrégeant facilement si on appuie sur la lamelle en donnant des aiguilles très fines d'un beau jaune clair (Hervieux) [111]. Ce corps est caractérisé par plusieurs propriétés remarquables. Il est complètement insoluble

ble dans l'eau froide et l'eau bouillante, l'éther, le benzène, l'éther acétique, l'alcool absolu bouillant ; très soluble dans la pyridine et le mélange alcool-pyridine. Desséché sur acide sulfurique, après lavage à l'alcool absolu froid, puis bouillant, son point de fusion est de 235° - 236° au bloc de Maquenne. En dissolvant 0 gr. 20 de cette substance dans un mélange de 4 centimètres cubes de pyridine et de 6 cc. d'alcool absolu, on obtient dans un tube de 10 cc. une déviation polarimétrique gauche de $-7^{\circ},10'$ à $-7^{\circ},30'$. Son pouvoir rotatoire très fortement lévogyre est en effet $[\alpha]_D = -369^{\circ}$.

Deux propriétés sont particulièrement caractéristiques de cette substance, ce sont, d'une part, son fort pouvoir rotatoire lévogyre et, d'autre part, son insolubilité dans l'alcool absolu bouillant.

La constitution exacte de cette substance n'a jamais été élucidée. Neuberg [193] prenait en considération trois possibilités de structure : soit l'hydrazone, soit l'hydrazide, les deux cristallisant avec deux molécules d'eau, soit le glycuronate de parabromophénylhydrazine. De nombreux auteurs et Neuberg lui-même pensent qu'aucune de ces trois formules ne correspond à la réalité. Ce dernier, dans un second mémoire [193] a préparé l'hydrazone véritable précédemment obtenue par Giemsa [86] et a constaté sa non identité avec la substance précédente.

Cette combinaison de Neuberg a été l'objet de nombreux travaux que nous allons brièvement résumer. Il faut surtout signaler ceux de Jolles [128], de P. Mayer et Neuberg [174], de Mayer [173], de Neuberg [203],

contenus dans son rapport sur « la physiologie des pentoses et de l'acide glycuronique », de Tschirch et Gauchmann [282], de Hervieux [111], de Bernier [18], de Lépine et Boulud [151-27], de Mayer [175], de Bial et Hubert [23], de Naidus [204], etc...

La plupart de ces auteurs ont pu obtenir des combinaisons présentant des propriétés analogues à celles de Neuberg. Cependant les modes opératoires n'étaient pas toujours identiques entre eux, et il semble bien que les produits obtenus étaient un peu différents, le contrôle analytique n'était pas toujours effectué et quelquefois il ne concordait pas. Naidus [204] a eu des résultats très mauvais avec le réactif de Neuberg et il conclut que ce procédé ne saurait être considéré comme pratique et bon pour la recherche de l'acide glycuronique.

Hervieux [111], au contraire, a appliqué avec succès cette méthode à la recherche dans les urines. Il a modifié la technique de Neuberg en ce sens qu'il emploie la parabromophénylhydrazine fraîchement préparée au lieu de son chlorhydrate, et l'acide acétique à raison de 1 goutte par cc. Il recommande de ne pas ajouter trop d'acide acétique et de laver le précipité formé sans retard avec l'alcool. Il faut que l'acide glycuronique soit débarrassé aussi soigneusement que possible de toute substance étrangère ; il faut pour cela opérer la défécation à fond avec l'azotate mercurique. Lorsqu'on se trouve en présence d'urines pauvres en ce composé, il est nécessaire soit de concentrer ce liquide, soit mieux, d'isoler les conjugués par l'acétate de plomb ammoniacal et d'hydrolyser par un acide

minéral. On neutralise la solution par de la soude ou du carbonate de baryum. Hervieux prétend que l'hydrazone se produit d'une façon transitoire dans la réaction, mais ceci est suivi de la formation de l'amide interne, ce qui ferait du corps obtenu une lactazame et non pas une hydrazone.

Bernier [18] a également obtenu cette combinaison. Il précise davantage les proportions qu'il faut employer ; il met en garde contre une cause d'erreur provenant de l'urée qui donne dans ces conditions de la parabromophénylsemicarbazide, aussi faut-il déféquer complètement par le réactif de Patein, ou mieux, isoler les conjugués sous forme de sel de plomb.

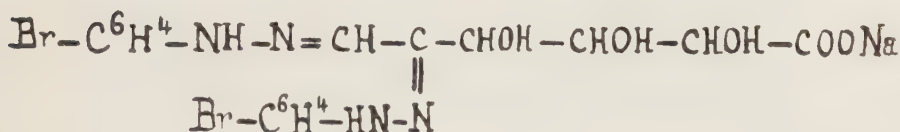
Goldschmiedt et Zerner [87], dans un important travail paru en 1912, indiquent qu'il leur a été impossible d'obtenir la combinaison parabromophénylhydrazinique correspondant à la formule de Neuberg. De très nombreuses expériences effectuées d'après la méthode de cet auteur, puis en variant largement les conditions d'expérimentation, ne leur ont donné aucun résultat ou des résultats si médiocres, qu'ils concluent que la technique de Neuberg est trop incertaine pour constituer une méthode sûre. Les précipitations qu'ils eurent l'occasion d'observer correspondaient cependant en gros à la description de Neuberg, mais elles contenaient toujours un résidu de cendres, et ils croient que bon nombre d'auteurs eurent en mains les mêmes produits sans s'en apercevoir. Ceci les conduisit à étudier systématiquement la préparation avec différents sels, ce qui leur a permis de mettre au point

une technique précise et fidèle. Voici l'exemple du sel de baryum.

On opère sur une solution contenant 1 % de lactone glycuronique (ou correspondant environ à un tel pourcentage). On l'additionne d'eau de baryte jusqu'à réaction alcaline définitive (la neutralisation ne se produit pas immédiatement). Si l'on a dépassé ce point, on peut éliminer le baryum en excès par l'anhydride carbonique. On ajoute à cette solution un mélange bouillant contenant 4 grammes de chlorhydrate de parabromophénylhydrazine pur et 6 grammes d'acétate de baryum cristallisé dissous dans 100 cc. d'eau distillée. On plonge le tout environ deux minutes dans un bain-marie bouillant, on agite à plusieurs reprises et on filtre chaud rapidement. Au filtrat jaune sombre, on ajoute 3 cc. d'acide acétique pur et on chauffe de nouveau au bain-marie bouillant pendant une demi-heure. On aperçoit bientôt des cristaux jaunes qui envahissent le récipient. On filtre, on les lave immédiatement à grande eau, puis à l'alcool éthylique absolu froid, puis bouillant, puis à l'éther. Sur le filtrat, on peut recommencer deux ou trois fois la même opération.

On obtient de petites aiguilles jaune clair, microscopiques. Ce corps est hygroscopique, il est presque insoluble dans l'alcool à 60° et dans la pyridine. Le point de fusion déterminé à l'appareil de Thiele est de 215°-217°, la substance brunit déjà un peu avant. W. Van der Haar [115] trouve 210°. Les sels de sodium, de calcium, de potassium, de zinc et de plomb ont été préparés. Ils présentent les propriétés générales de la combinaison de Neuberg. Contrairement

au produit de cet auteur, ce sont des corps rigoureusement définis et dont la constitution connue répond à celle de la parabromophénylosazone du glycuronate (de sodium, par exemple), de formule suivante, vérifiée par l'analyse.



La même année, Jolles [133] reprend les expériences de Neuberg et prétend que la difficulté rencontrée par Goldschmiedt et Zerner provient d'une légère impureté contenue dans le chlorhydrate de parabromophényldrazine. Ceux-ci [100] répètent leurs expériences avec un réactif soigneusement purifié, mais ils ne peuvent que confirmer leurs premières conclusions. La réussite de la préparation du composé de Neuberg dépend de conditions tellement subtiles, que cette réaction n'est pas adaptée à la recherche de l'acide glycuronique, alors que la technique qu'ils préconisent est sûre et fidèle. Notons tout de suite que la grande majorité des auteurs récents a confirmé les recherches des deux chimistes autrichiens. Citons en particulier les travaux de Aoyama [6], de Levene et La Forge [153], de Hopkins, de Peterson et Fred [118], etc... Levene et La Forge étudiant la structure de l'acide chondroïtine sulfurique, ont été amenés à caractériser d'une façon nette l'acide glycuronique dont la présence était niée par certains auteurs. Ils ont obtenu avec la parabromophénylhydrazine, un dérivé ayant la compo-

sition de la substance décrite par Goldschmiedt et Zerner. Ils écrivent : « En accord avec eux, nous avons été incapables d'obtenir la substance décrite par Neuberger. Cependant la formation d'un dérivé avec une seule molécule d'hydrazine pour 1 molécule de glycurone n'est pas impossible à priori. Nous n'avons pas fait d'effort spécial pour l'obtenir, étant donné que le corps de Goldschmiedt et Zerner se forme très facilement à la fois d'une solution de glycurone pure et des solutions de produits d'hydrolyse de la chondrosine. »

Il est important d'opérer avec un réactif bien préparé. Hervieux [111] dans la description de sa technique, considère la parabromophénylhydrazine comme un liquide. Bernier [18] a toujours eu entre les mains un corps cristallisé. Nous avons également possédé un échantillon cristallisé, mais au bout de 6 mois, nous nous sommes aperçu qu'il était tombé en déliquescence et constituait alors un liquide fortement brun. La préparation de ce corps peut s'effectuer suivant le procédé de Michaelis [177], son point de fusion est de 107°-109°. Il faut le conserver à l'abri de la lumière, de l'air et de l'humidité. Il est nécessaire, immédiatement avant l'usage, de faire recristalliser même des échantillons considérés comme les plus purs [187].

En ce qui concerne les perturbations apportées par les sucres, il faut remarquer que le rhamnose, le glucose précipitent également sous forme de parabromophénylosazone qui sont assez peu solubles dans l'alcool fort. Par contre, la présence de xylose, d'arabinose et de fructose ne gêne pas, leurs osazones sont très solubles. Le mannose et le galactose donnent des hydrazones (W. van der Haar [115]). La séparation devient

très difficile lorsqu'on se trouve en présence d'une grande quantité de glucose et d'une faible proportion d'acide glycuronique, car tout se dissout dans l'alcool absolu (Hervieux) [111].

La technique de Goldschmiedt et Zerner, appliquée aux acides galacturonique et mannuronique, donne toujours l'hydrazone au lieu de l'osazone [187]. Cette méthode est considérée comme un des moyens les plus sûrs de caractérisation de l'acide glycuronique.

III. — COMBINAISONS AVEC LA PHÉNYLHYDRAZINE

Nous renvoyons à la thèse très documentée de Bernier [18] pour l'historique détaillée de l'action de la phénylhydrazine sur l'acide glycuronique. Signalons seulement que, parmi les nombreux auteurs qui s'étaient occupés de la question avant celui-ci, en émettant des opinions aussi différentes, d'ailleurs, les unes que les autres, Thierfelder [273] semble être le seul à avoir obtenu une osazone cristallisée, cependant encore impure, à point de fusion 114°-115°. Mais c'est à Bernier que revient le mérite, dans une étude remarquable, d'avoir préparé un corps parfaitement cristallisé, à point de fusion défini, obtenu par une technique sûre. Après de nombreux essais infructueux, cet auteur réussit à préparer une substance bien cristallisée, par l'action de l'acétate de phénylhydrazine employé en excès sur une solution pure de glycuronate de baryum. Il est nécessaire d'opérer sur les sels et non pas sur

l'acide lui-même dont les solutions doivent toujours être accompagnées de lactone qui trouble les réactions. Il est intéressant de constater que, comme la combinaison avec la parabromophénylhydrazine, celle fournie par la phénylhydrazine ne se produit bien que sur des solutions de sels de l'acide glycuronique. Goldschmiedt et Zerner, deux ans plus tard, utilisaient un procédé analogue.

Bernier a montré de plus que l'on pouvait obtenir cette combinaison très facilement avec l'urine normale en opérant de la façon suivante :

Déféquer 50 cc. d'urine avec 5 cc. de réactif de Courtonné, filtrer et hydrolyser le filtrat avec 5 % d'acide chlorhydrique à l'ébullition au bain de sable pendant 10 minutes, ou avec 1 % d'acide sulfurique à l'autoclave à 120° pendant cinq minutes.

Neutraliser l'acide chlorhydrique après refroidissement par le carbonate de plomb (environ 4 grammes pour 1 cc. d'acide) ou l'acide sulfurique à chaud par du carbonate de baryte, filtrer. Opérer avec les proportions suivantes : Ajouter à 20 cc. de filtrat, 1 cc. de solution d'acétate de soude à 25 %, 1 cc. d'acide acétique cristallisable et 1 cc. de phénylhydrazine pure; porter le tout au bain-marie bouillant pendant trois quarts d'heure et laisser le refroidissement s'opérer dans le bain-marie. Après douze ou vingt-quatre heures, examiner les cristaux au microscope, recueillir le précipité sur un filtre, le laver à l'eau, le sécher dans le vide. Le point de fusion sera voisin de 150°. Pour la purification, on lave les cristaux à la benzine et on les introduit dans un tube à essai avec une petite

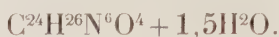
quantité d'eau distillée et on porte le tout au bain-marie bouillant pendant quelques instants ; on filtre pour séparer la glucosazone qui les accompagne toujours et la combinaison glycuronique cristallise par refroidissement. Après dessiccation dans le vide, on prend le point de fusion au bloc Maquenne par la méthode de fusion instantanée ; il doit être voisin de 130° - 132° .

La substance obtenue se présente le plus souvent sous l'aspect de cristaux jaunes aciculaires, groupés en étoiles, ou de cristaux lamellaires réunis en rosettes, mais ceci n'est pas caractéristique. Elle est insoluble dans l'éther et dans le benzène, elle est soluble dans l'eau chaude, l'alcool méthylique et l'acétone au demi.

Plusieurs auteurs ont retrouvé les conclusions de Bernier, en particulier Levene et La Forge [153], Levene et Lopez-Suarez [148], Takahashi et Asai [275], Chouchak [45]. Le corps obtenu présentait les propriétés décrites par Bernier, solubilité, point de fusion, etc...

Quelle est la constitution de cette substance ? Grimbert et Bernier admettent que c'est une osazone, du seul fait que le produit se forme à la température du bain-marie bouillant, mais ils n'indiquent aucun contrôle analytique. Levene et La Forge prouvent que leur dérivé présente toutes les propriétés et la composition de la phénylhydrazide de l'osazone, et ils le trouvent identique à celui obtenu par Thierfelder. Ces résultats sont confirmés par Levene et Lopez-Suarez qui indiquent un point de fusion avec décomposition à $+ 132^{\circ}$ (corrigé). Des échantillons mal purifiés fon-

dent à 115° , chiffre donné par Thierfelder. La formule vérifiée par l'analyse est la suivante :



Il s'agit par conséquent de l'hydrazide osazone de l'acide glycuronique. Chouchak obtient, lui aussi, un composé fondant à 131° - 132° après recristallisation et présentant toutes les propriétés du corps de Bernier, certains échantillons fondent à 114° - 115° . il le qualifie de glycurosazone en citant Maquenne. Takahashi indique également 131° - 132° .

Cette combinaison est caractéristique de l'acide glycuronique. La concordance des points de fusion indiqués depuis Bernier par la plupart des auteurs est un fait remarquable si l'on songe à la variabilité souvent notable présentée par les constantes physiques des dérivés les mieux définis de cet acide uronique. Il paraît donc très vraisemblable que dans tous les cas il s'est agi du même corps, il semble donc que l'on a affaire à la phénylhydrazide de la glycurosazone. Cependant il est nécessaire de faire remarquer que, récemment, Fleury et Ambert [71], reprenant les expériences de Bernier sur la formation de la combinaison phénylhydrazinique de l'acide glycuronique, à partir des urines normales, ont confirmé en tous points les résultats de ce dernier, sauf en ce qui concerne le point de fusion qu'ils ont trouvé voisin de 160° - 175° par fusion instantanée. D'autre part, ils indiquent que Patterson établit par combustion que la formule du produit purifié provenant de l'urine, correspond à celle d'une hexosazone, mais le point de fusion de

cette hexosazone serait de 170°-182°. Il faut noter que toutes ces expériences portent sur l'urine. Il est possible que l'acide glycuronique pur donne dans les conditions habituelles avec la phénylhydrazine une combinaison correspondant à la formule de Levene, mais que dans l'urine la complexité du milieu intervienne pour entraver quelquefois la marche de la réaction et donner finalement des corps qui sont des mélanges.

Pour nous résumer, nous pouvons donc conclure que, du point de vue qualitatif, on pourra affirmer la présence de l'acide glycuronique si les trois réactions que nous venons d'indiquer, *surtout les deux dernières*, sont positives. Mais nous verrons qu'il est plus intéressant en clinique de pouvoir apprécier les variations quantitatives de la glycuronurie ; de plus, en chimie végétale le problème du dosage des acides uroniques dans les tissus des végétaux se pose de plus en plus fréquemment. Aussi nous allons consacrer quelques pages à cette question.

Examen quantitatif

I. — OBSERVATIONS PRELIMINAIRES

Un très grand nombre de procédés ont été proposés comme méthode de dosage de l'acide glycuronique, c'est assez dire que fort peu doivent être satisfaisants. Dès le début, nous croyons nécessaire d'établir une distinction nette, identique à celle que nous avons déjà faite pour l'examen qualitatif. Les techniques applicables à l'heure actuelle aux recherches autres que celles de chimie biologique (chimie végétale, par exemple) sont des procédés que l'on peut considérer comme sensiblement exacts. Par contre, il n'en est pas de même en ce qui concerne les méthodes applicables à ces milieux éminemment complexes que sont les liquides biologiques ; de gros efforts ont été tentés pour la mise au point de méthodes analytiques correctes, on peut obtenir maintenant par l'emploi de techniques récentes, des approximations bien meilleures qu'il y a quelques années ; cependant, il semble que ces procédés n'ont pas été soumis à une étude critique suffisamment approfondie.

Nous nous bornerons à établir une classification de ces méthodes aussi rationnelle que possible, nous en indiquerons brièvement le principe et signalerons les principales critiques. Nous nous étendrons un peu plus

longuement sur deux techniques qui sont considérées actuellement comme les meilleures.

La plus grande partie représente des méthodes d'estimation entachées d'une notable erreur, ce qui se traduit par exemple pour la détermination de la quantité d'acide glycuronique dans l'urine par des résultats variant de 1 à 10 et plus. Indépendamment du fait qu'il est très difficile de trouver un procédé de dosage d'un corps qui présente si peu de propriétés vraiment caractéristiques, la plupart ont manqué d'une base solide par suite de l'absence d'un produit de référence étalon. Nous avons vu que la préparation de la lactone était autrefois une préparation très délicate, l'obtention d'un produit pur se révélait souvent impossible, la préparation de l'acide glycuronique lui-même ne date que de 1925. Aussi un certain nombre de méthodes n'ont-elles pas été vérifiées avec des produits purs. De plus, certaines données expérimentales se sont trouvées inexactes : le pouvoir rotatoire de certains glycuronides, par exemple la découverte de celui de l'acide beaucoup plus élevé que celui de son anhydride, de même en ce qui concerne le pouvoir réducteur.

II. — TEMPS DE LA TECHNIQUE

En général, les différents temps de la méthode sont les suivants. D'abord, il s'agit d'isoler le conjugué, cette opération est particulièrement difficile en ce qui concerne les urines. Cet isolement doit, en effet, être

aussi sélectif que possible ; il doit permettre l'obtention de la totalité du glycuronide, celui-ci doit être accompagné du minimum de substances étrangères, et enfin cette opération ne doit pas l'altérer. Deux procédés sont valables dans ce but, la précipitation par le sous-acétate de plomb ammoniacal et surtout l'extraction par l'éther ; nous verrons plus loin leurs avantages respectifs.

Le glycuronide isolé, il s'agit de le doser ; souvent on est obligé d'effectuer un dédoublement préalable. Celui-ci doit permettre une hydrolyse rapide, totale et ne présentant pas d'action destructrice sur l'acide glycuronique libéré. Plusieurs facteurs doivent être considérés : nature de l'acide, concentration, température de chauffe, durée de contact, etc...

Enfin, la dernière opération nécessitera la détermination quantitative de l'acide glycuronique libéré ; étant donné les faibles quantités à doser, il sera préférable, comme nous le verrons, d'avoir recours aux micro-méthodes.

Telles sont les principales qualités requises pour qu'une méthode puisse être appliquée à l'étude quantitative. Fort peu réalisent ces conditions.

III. — EXPOSE DES METHODES

Nous avons classé les différents procédés en méthodes polarimétriques, méthodes colorimétriques et méthodes proprement chimiques.

A. — MÉTHODES POLARIMÉTRIQUES

Cette méthode physique a été autrefois très utilisée, soit directement sur l'urine déféquée au préalable par l'acétate de plomb en milieu acide, soit après isolement de l'acide glycuronique sous forme de combinaison parabromophénylhydrazinique [151-27].

Ces procédés ne donnent que des résultats très approximatifs, les auteurs eux-mêmes le reconnaissent [254]. En effet, nous avons vu avec quelles difficultés on obtenait la combinaison de Neuberg ; quant à la technique de Goldsmiedt et Zerner, elle ne donne pas de résultats quantitatifs. D'autre part, l'urine n'est pas un solvant convenable pour une détermination polarimétrique exacte. Sa complexité introduit nombre de facteurs dont l'influence ne peut être contrôlée ou corrigée de façon satisfaisante. La méthode est inapplicable si les autres substances actives n'ont pas été éliminées. Sans doute le glucose et les autres sucres pourront être enlevés par fermentation, mais l'acide glycuronique serait, lui aussi, très légèrement fermentescible. Enfin il y a relativement peu de conjugués préparés et décrits à l'état de pureté, de sorte que leur pouvoir rotatoire et celui de leurs dérivés n'est pas suffisamment précisé (Quick) [220].

B. — MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES

La principale technique colorimétrique est basée sur la réaction colorée à la naphtorésorcine. De bonne heure on a eu l'idée d'appliquer cette réaction à un

dosage colorimétrique. Nous avons vu que Tollens [281] prétendait que la limite de sensibilité de la réaction était de l'ordre de 5 dixièmes de milligramme à 1 milligramme d'acide glycuronique avec les quantités de réactifs utilisées. Par dilution progressive de l'urine, on arrive à trouver un résultat négatif. Le dernier échantillon montrant une réaction positive doit contenir 5 dixièmes de milligramme à 1 milligramme d'acide, un calcul rapide permet de fixer la teneur des urines non diluées.

Chiray et Caille [46-44] obtiennent un dosage approximatif de l'acide glycuronique urinaire au moyen de la méthode au plomb de Roger, en comparant les teintes violettes obtenues avec celles d'une échelle colorimétrique préalablement étalonnée au moyen de réactions faites dans les mêmes conditions sur des solutions d'acide glycuronique. On peut aussi comparer l'intensité de la teinte fournie par la réaction sur l'urine avec celle de la solution étalon au colorimètre. Ces auteurs obtiennent ces solutions étalons par leur méthode d'oxydation des hétérosides et ils en dosent l'acide glycuronique par le procédé de Medigreceanu [178]. En pratique, d'ailleurs, ils se servent d'une échelle imitée obtenue au moyen de rouge neutre et de violet de gentiane phéniqué.

Ces méthodes de dosage peuvent donner lieu à de nombreuses objections. Schmid [254], Amer [5], Savy et Velluz [264], Pernet [216] en ont formulées. Nous résumons une partie de celles contenues dans la thèse d'Amer. Tout d'abord, les substances utilisées pour fabriquer ces échelles sont très instables, elles sont

détruites au bout de peu de temps. L'échelle vraie donne des teintes franchement violettes, mais l'échelle imitée donne des teintes violet rouge. Les urines montrent des colorations qui souvent ne sont comparables ni à une gamme, ni à l'autre. Enfin et surtout, la critique la plus importante provient de la non spécificité de la réaction. Nous avons insisté assez longuement sur ce point dans l'étude qualitative pour qu'il soit inutile d'y revenir ici.

Cependant ces procédés colorimétriques à la naph-torésorcine pourraient peut-être devenir plus exacts si on leur appliquait les nouvelles techniques dont nous avons parlé et en particulier la réaction de Neuberger et Kobel [190].

D'autres méthodes colorimétriques ont été proposées, nous avons vu celle de Scheff [257] utilisant le réactif de Bial pour un dosage spectrophotométrique de l'acide glycuronique en solution pure. On a également dosé le furfurool produit par chauffage des conjugués en présence d'acide chlorhydrique en comparant la teinte obtenue lorsqu'on additionne d'acétate d'aniline le liquide distillé avec une liqueur étalon contenant un centigramme de furfurool par litre et traitée de la même manière.

C. — MÉTHODES CHIMIQUES

Ces méthodes sont de beaucoup les plus nombreuses, nous les avons classées de la façon suivante : Dosage à l'état d'acide saccharique, procédés utilisant la distillation avec l'acide chlorhydrique ou l'acide

sulfurique, la détermination du pouvoir réducteur de l'acide glycuronique libre, et enfin la technique alcalimétrique.

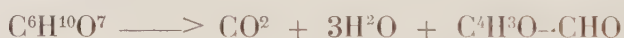
Il n'est pas possible, du moins actuellement, d'utiliser comme méthode de dosage l'isolement sous forme de phénylhydrazide osazone de l'acide glycuronique ou de parabromophénylosazone du glycuronate de baryum. On sait, en effet, que les combinaisons hydraziniques ne se forment pas d'une façon quantitative. On peut signaler le procédé de Denigés [55], pour le dosage du glucose sanguin par la méthode des osazones. Mais à notre connaissance une seule technique est employée et exacte, c'est celle de Bourquelot et Hérissé [29] pour le dosage du mannose, mélangé à d'autres sucres, à l'état d'hydrazone. Pour cela, il est nécessaire d'opérer avec des solutions renfermant de 3 à 6 % de mannose ; si le pourcentage est plus faible, les résultats sont entachés d'erreurs. Pour une solution de 0,50 %, l'erreur est de 7,9 %. Il est donc illusoire de vouloir appliquer ces méthodes de combinaisons hydraziniques à l'acide glycuronique urinaire dont le taux est de l'ordre de 0,30 ‰. C'est aussi l'avis de Biberfeld [30].

1° DOSAGE A L'ÉTAT DE SACCHARATE D'ARGENT. — Neuberg et Neimann [197] ont proposé d'hydrolyser les conjugués glycuroniques urinaires en tube scellé par l'acide bromhydrique et en présence de brome qui transforme l'acide formé en acide saccharique qu'on précipite à l'état de sel de baryte basique et qui est ensuite transformé en sel bi-argentique que l'on recueille et que l'on dessèche. Malheureusement cette

technique n'est quantitative que dans le cas de l'acide phénolglycuronique ; elle est beaucoup moins exacte avec le menthol glycuronide, ne donne avec l'acide euxanthique que des rendements de 60 à 70 % et est inapplicable avec l'acide urochloralique [296].

2° DOSAGE ALCALIMÉTRIQUE. — Cette méthode fut appliquée par Schmidt et ses collaborateurs [265] au dosage de l'acide glycuronique libre provenant du traitement des hémicelluloses. Il s'effectue au moyen de solutions décimales d'hydroxyde alcalin en excès, suivi d'un titrage conductométrique avec une solution décimale d'acide chlorhydrique. Il est utilisé exclusivement en chimie végétale.

3° DOSAGES PAR DISTILLATION AVEC L'ACIDE CHLORHYDRIQUE OU SULFURIQUE. — Nous avons vu à propos des propriétés chimiques que l'acide glycuronique libre ainsi que ses conjugués dégagent par distillation en présence d'acide chlorhydrique ou sulfurique du furfural et de l'anhydride carbonique [170]. La réaction s'effectue suivant la formule :



C'est sur ce fait que se trouvent basées deux méthodes de dosage, de valeur très inégale d'ailleurs. On peut, en effet, faire une détermination quantitative soit du gaz carbonique soit du furfural.

a) *Dosage par détermination du furfural*

Cette méthode constitue un des plus anciens procédés de dosage de l'acide glycuronique. Nous avons

rappelé plus haut que cette propriété de donner du furfurol avait été constatée sur l'urine avant même la découverte de la présence de cet acide dans ce liquide [85]. Le fufurol produit peut être dosé colorimétriquement, volumétriquement ou gravimétriquement.

a) *Par la méthode colorimétrique* : En comparant la teinte obtenue par addition d'acétate d'aniline. Ce procédé a été signalé plus haut, nous n'y reviendrons pas, il a été très peu utilisé.

b) *Par la méthode volumétrique* : On peut effectuer le titrage du furfurol à l'aide d'une solution d'acétate de phénylhydrazine ajoutée jusqu'à ce que le mélange ne réagisse plus sur l'acétate d'aniline et titrée de la même manière sur une solution connue de furfurol [18].

Cet aldéhyde peut aussi se combiner au bisulfite de potassium. Haendel [120] a récemment repris cette technique. Le furfurol libéré au cours de la distillation chlorhydrique du précipité obtenu par l'action du sous-acétate de plomb ammoniacal sur l'urine, est déterminé au moyen d'une solution bisulfitique ajoutée en excès. Cet excès est ensuite titré par iodométrie. La quantité de furfurol ainsi déterminée multipliée par 6 donne la quantité d'acide glycuronique dans la prise d'essai. Le sang est traité de la même manière mais après déprotéinisation par l'acide phosphotungstique. Cette technique participe aux critiques de la méthode générale que nous verrons plus loin.

c) *Par la méthode pondérale* : C'est ce procédé qui a été le plus employé. On peut précipiter le furfurol

à l'état de furfurol-phénylhydrazone qu'on sèche à 60°-70° et qu'on pèse. Flint et Tollens conseillent d'opérer la précipitation dans l'eau salée, où l'hydrazone est moins soluble. On peut aussi effectuer la précipitation à l'état de furfuramide (Stone) [18]. Mais c'est surtout la combinaison sous forme de furfurol-phloroglucide qui a été utilisée. Elle se forme en traitant le distillat par de l'acide chlorhydrique en excès et de la phloroglucine dans la proportion de deux à trois parties pour une de furfurol (Welbel et Zeisel) [18].

Lefèvre et B. Tollens [154] ont bien étudié cette méthode. Le furfurol produit par distillation de l'urine avec de l'acide chlorhydrique ($D=1,06$), est traité par de la phloroglucine et le phloroglucide est pesé. Des déterminations effectuées à partir de la lactone pure leur ont permis de constater que la quantité de furfurol obtenue ne représentait que le tiers de la quantité théorique. C. Tollens critique la méthode précédente et démontre que l'urée réagit avec le furfurol, occasionnant ainsi des pertes qui introduisent une grosse cause d'erreur. Il recommande d'opérer non pas directement sur l'urine mais d'isoler les conjugués sous forme de sels de plomb, il aurait obtenu par cette méthode une assez bonne approximation. Avec Stern [283] il signale une cause d'erreur par excès celle-là, et provenant du furfurol libéré par le papier filtre. Morel et Fraisse [179] ont utilisé ce procédé par précipitation à l'état de furfurol phloroglucide pour doser les pentoses et l'acide glycuronique dans les organes des animaux. F. Medigreceanu [178] a

légèrement modifié la technique de Tollens, il l'a utilisée pour déterminer les variations quantitatives de la glycuronurie au cours de la pneumonie. Nous allons brièvement résumer ce procédé qui, jusqu'à ces dernières années était considéré comme le meilleur. Les conjugués urinaires sont isolés au moyen du sous-acétate de plomb ammoniacal, le précipité plombique est soigneusement lavé par centrifugation. On n'utilise pas de papier-filtre de façon à éliminer cette cause d'erreur variable et non contrôlable. Le précipité est versé quantitativement dans un ballon contenant de l'acide chlorhydrique à 12 p. 100 ($D=1,06$), et on effectue la distillation. Lorsque celle-ci s'est opérée à moitié on ajoute encore de l'acide chlorhydrique à 12 p. 100 et ainsi de suite jusqu'à obtention de 600 cc. de distillat (si la prise d'essai est de 250 cc. d'urines fraîches). On ajoute ensuite au distillat de la phloroglucine dissoute dans l'acide chlorhydrique à 12 p. 100. On laisse la précipitation s'opérer pendant 16 heures, on recueille sur filtre de Gooch, on lave, on dessèche à 100° à poids constant et on pèse. Une correction pour le phloroglucide resté en solution doit être faite.

Une partie du furfurol peut être détruite par contact prolongé avec les acides forts, aussi Pervier et Gartner [217] proposèrent de distiller dans un courant de vapeur d'eau qui élimine le furfurol au fur et à mesure de sa formation. Quick [220] qui a étudié cette technique trouve que le rendement est insuffisant et l'opération beaucoup trop lente, il faut au minimum huit heures de chauffe pour obtenir la moitié seulement du rendement théorique.

Ces méthodes au furfurol donnent lieu en effet à de sérieuses objections. Elles sont tout d'abord assez empiriques puisque les quantités de furfurol obtenues en général ne représentent qu'un tiers environ du rendement théorique. D'autre part elles impliquent que les dérivés glycuroniques fournissent des proportions définies de furfurol alors que Mann, Kruger et Tollens [180] admettent des quantités variables avec chaque dérivé. Enfin et surtout elles ne sont nullement spécifiques, les pentoses, les pentosanes, les nucléoprotéïdes fournissent de grandes quantités de furfurol, or il nous est souvent impossible d'éliminer de telles substances. Ces méthodes sont donc bien plutôt des procédés de dosage des pentoses que de l'acide glycuronique.

β) Dosage par détermination de l'anhydride carbonique

La décomposition de l'acide ou des glycuronides par l'acide chlorhydrique à 12 p. 100, produit, outre le furfurol, du gaz carbonique que l'on peut déterminer. Dans les mêmes conditions les pentoses ne donnent pas de dégagement d'anhydride carbonique. Il s'agit donc d'un procédé beaucoup plus spécifique. Lefèvre et Tollens [154] avaient déjà remarqué tout le profit que l'on pouvait tirer d'un tel fait. Par dosage du gaz carbonique sur des produits purs ils avaient constaté que l'erreur commise ne dépasse guère 0,2 p. 100. Lefèvre [155] dans sa thèse consacre des travaux à l'étude de ce procédé et à la mise au point des appareils. Aussi il est curieux de constater qu'il faut arriver

aux toutes dernières années pour voir cette méthode appliquée à l'urine. C'est tout d'abord en chimie végétale qu'elle fut utilisée.

a) *Méthode gazovolumétrique* : Ce procédé a été employé par Schwalbe et Feldtmann [266] pour doser l'acide glycuronique dans les fibres végétales. Après avoir traité une pulpe de cellulose de paille à l'autoclave à 130° plusieurs heures avec des solutions alcalines puis acides, le liquide refroidi, neutralisé en présence de rouge congo par du carbonate de baryum et filtré, est précipité par de l'acétate basique de plomb. Les glycuronides ainsi obtenus sous forme de sels de plomb sont traités par de l'acide chlorhydrique à 12 p. 100 et l'on dose l'acide glycuronique par mesure du volume de gaz carbonique dégagé.

b) *Méthode volumétrique* : Nanji [181] et ses collaborateurs étudiant la constitution des pectines, furent amenés à faire des recherches sur la décarboxylation des acides polyhydroxylés, et à établir une méthode de dosage de ces corps. Ils confirmèrent les travaux de Lefèvre et Tollens ; contrairement à ce qui se passe dans le cas du furfurol, l'anhydride carbonique dégagé au cours du chauffage avec de l'acide chlorhydrique correspond sensiblement à la quantité théorique. Ce fait peut donc devenir la base d'une méthode de dosage de l'acide glycuronique et des acides uroniques en général (ceux-ci se comportant dans ce cas comme celui-là).

La substance contenant de 0 gr. 20 à 0 gr. 50 d'acide uronique est placée avec 100 cc. d'acide chlorhydrique ($D=1,06$) et on pratique la distillation. Le

gaz carbonique dégagé est absorbé dans des tubes contenant 100 cc. de solution de baryte décimale; 25 cc. de liquide surnageant sont titrés avec de l'acide chlorhydrique décimormal en présence de méthylorange. On calcule le pourcentage de gaz carbonique et la valeur trouvée multipliée par quatre donne le pourcentage en anhydride uronique.

Dickson, Otterson et Link [53] ont étudié et précisé les différents temps de cette méthode, en même temps qu'ils en faisaient une étude critique. Ils modifient également l'appareil et adoptent de nouvelles colonnes d'absorption. Ils opèrent la décarboxylation à 135°-140° pendant cinq heures. Ils emploient la méthode par reste et titrent l'excès de baryte en présence de phtaléine.

C'est une technique très utilisée en chimie végétale. Sur des produits suffisamment purs elle donne des résultats sensiblement théoriques. Appliquée à des produits végétaux elle permet d'obtenir, de l'avis de la majorité des auteurs, une bonne approximation.

c) *Méthodes pondérales* : C'est en utilisant la méthode gravimétrique que Lefèvre et Tollens [154] dosèrent le gaz carbonique dégagé au cours de la distillation chlorhydrique. Cette technique ne fut pas utilisée jusqu'en 1930, date à laquelle Sauer l'appliqua pour la première fois à l'urine [267].

Les conjugués glycuroniques sont extraits par l'éther acide et le résidu de l'évaporation est soumis à la distillation avec de l'acide chlorhydrique à 12 p. 100, le gaz carbonique est dosé par pesée.

L'urine des vingt-quatre heures est recueillie et

traitée par 10 p. 100 de son volume d'acide sulfurique à 1 p. 10. Cette urine acidulée est soumise à l'extraction pendant vingt-quatre heures dans deux grands appareils de Soxhlet. L'extrait éthéré est recueilli dans un ballon de 500 cc. à large ouverture, et l'éther évaporé au bain-marie. On ajoute alors au résidu de l'évaporation 100 cc. d'acide chlorhydrique à 12 p. 100 et on place le ballon en connexion avec l'appareil de Lefèvre, légèrement modifié. On chauffe au bain de sable petit à petit jusqu'à l'ébullition que l'on maintient pendant huit heures. Le gaz carbonique dégagé barbotte dans des flacons laveurs remplis d'eau, est desséché par passage dans une tour de chlorure de calcium anhydre et finalement absorbé dans des tubes à potasse. Pendant tout le cours de l'opération un courant lent d'air privé de gaz carbonique circule à travers l'appareil.

Cette méthode permet de doser les conjugués glycuroniques urinaires solubles dans l'éther. On ignore encore si l'urine normale contient de l'acide glycuronique libre et des conjugués insolubles dans l'éther, que l'on ne pourrait pas déterminer par ce procédé. Une quantité connue d'acide glycuronique pur ajoutée à l'urine a pu être retrouvée par l'auteur avec une bonne approximation. Cependant cette méthode, bien que supérieure aux précédentes, ne semble pas avoir été l'objet d'une étude critique suffisante. En particulier les constituants organiques urinaires extraits par l'éther, comme les acides organiques, outre les acides volatils, sont-ils présents en grande quantité ? Sont-ils susceptibles d'être décarboxylés pendant l'opé-

ration ? Il semble bien cependant d'après les travaux de Dickson [56] que cette source possible d'erreur est minime. Il a vérifié que la distillation avec l'acide chlorhydrique ($D=1,06$) donnait des résultats exacts en présence des acides organiques habituellement rencontrés dans les végétaux, soit hydroxylés, soit dicarboxylés, les sucres et les acides sucrés dicarboxylés et beaucoup de polysaccharides. Le gaz carbonique dégagé par ces corps est très faible. Des recherches ultérieures confirmeront donc peut-être la valeur de cette méthode ; cependant elle présente au point de vue pratique un gros inconvénient, c'est la longueur des opérations. Nous allons voir maintenant un procédé aussi exact et plus rapide.

4° DOSAGES BASÉS SUR LE POUVOIR RÉDUCTEUR DE L'ACIDE GLYCURONIQUE LIBRE. — Nous avons vu que le pouvoir réducteur de cet acide pouvait être mesuré vis-à-vis de l'indigotine tétrasulfonate de potassium ; mais ce sont surtout des sels de cuivre qui ont été utilisés pour le dosage.

Nous allons tout de suite exposer la méthode de Quick [220] légèrement modifiée qui fut appliquée par son auteur à la détermination quantitative de l'acide mentholglycuronique dans l'urine. Elle peut être utilisée avec succès pour beaucoup de conjugués solubles dans l'éther et elle a été appliquée tout récemment à l'urine normale de chien.

Elle comprend les temps suivants : 1° Epuisement à l'éther de l'urine alcalinisée par le carbonate de soude ; 2° Epuisement à l'éther en milieu acide qui

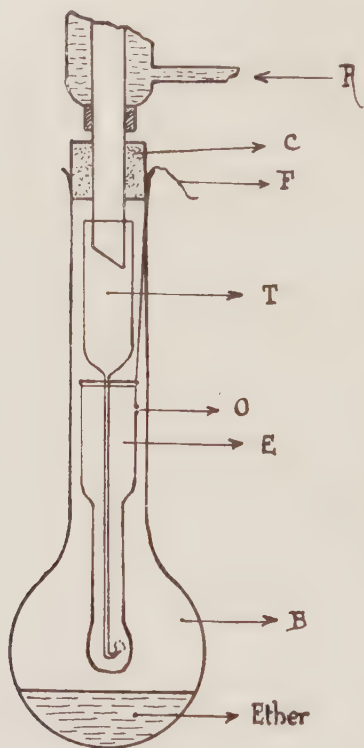
extrait les conjugués, les séparant des sucres réducteurs ; 3° Hydrolyse du glycuronide par ébullition avec l'acide chlorhydrique normal sous condensateur à reflux ; 4° Dosage soit par macrométhode, soit par microméthode (urines normales).

L'épuisement s'effectue au moyen d'un appareil à extraction continue du type de celui utilisé par Clausen [47] pour le dosage de l'acide lactique. La figure 1 permet de se rendre compte de la disposition de l'appareil.

« B » est un ballon de Kjeldahl de 300 cc. en verre Pyrex ; « R » un réfrigérant à reflux adapté au ballon au moyen d'un bouchon de caoutchouc ; « E » le tube à extraction en verre dont la partie rétrécie a une longueur d'environ 180 millimètres et un diamètre intérieur de 14 millimètres. Il est nécessaire que l'on puisse opérer avec 10 cc. de liquide. L'extrémité inférieure de ce tube est légèrement renflée, de plus il possède au voisinage de la portion supérieure un orifice « O ». « T » est un tube à entonnoir dont la tige présente un diamètre d'environ un millimètre. L'extrémité inférieure de cette tige est légèrement recourbée et présente à ce niveau un petit renflement percé de trous, dirigés obliquement et non pas latéralement. Le tube à extraction « E » est maintenu à l'aide d'un mince fil de cuivre « F » que l'on coince entre le bouchon et le col du ballon.

Voici comment l'on opère : La première extraction en milieu alcalin qui avait pour but d'éliminer les dérivés oxyaromatiques présentant des propriétés réductrices, a été reconnue par Quick inutile en pra-

tique. Un échantillon de 10 cc. d'urine filtrée (5 cc. si la concentration en conjugués est supposée élevée) est placé dans le tube extracteur « E » et acidifié avec 1 cc. d'acide sulfurique à 20 p. 100. On verse 50 cc.



d'éther éthylique pur dans le ballon et on plonge le tiers environ de la partie renflée dans l'eau d'un bain-marie portée sensiblement à 70°. L'éther vaporisé est condensé par le réfrigérant, qui le déverse dans l'entonnoir, dont la tige l'amène à la partie inférieure du liquide à extraire, à travers lequel il remonte en bulles, emplit la partie supérieure du tube « E » et se déverse

par l'orifice « O », pour recommencer le même cycle. L'extraction est poursuivie pendant deux heures et demie. Il est prudent néanmoins quand on se sert d'un appareil nouveau de redéterminer le temps d'extraction et d'analyser un nouvel échantillon pendant une demi-heure de plus pour s'assurer que l'extraction est complète. L'extrait éthéré est ensuite transvasé quantitativement ainsi que l'éther de lavage dans un Erlenmeyer de 100 cc. Le solvant volatil est évaporé à l'ébullition et le résidu hydrolysé par chauffage à reflux pendant 15 minutes avec 10 cc. d'acide chlorhydrique normal. L'acide glycuronique est mis en liberté. On refroidit et on neutralise le liquide par une solution de soude normale.

On effectue maintenant la détermination de l'acide par une méthode de dosage des sucres. Si la quantité est assez forte on emploie une macrométhode, sinon on utilise une microméthode (Folin et Wu par exemple). On fait d'abord un dosage approximatif sur une partie aliquote de façon à pouvoir opérer les dilutions nécessaires. Si on emploie la macrométhode de Bénédict [31] on dilue la solution dans un ballon jaugé à un volume tel que la concentration de l'acide glycuronique soit de l'ordre de 0 gr. 10 à 0 gr. 15 pour cent. Cette solution est filtrée pour éliminer le menthol ou le bornéol (suivant le cas) qui a une tendance à adhérer au verre et cause ainsi des erreurs dans la lecture du volume de la burette. 10 cc. de réactif de Bénédict et 2 grammes de carbonate de soude anhydre sont placés dans un Erlenmeyer de 100 cc. et chauffés à l'ébullition. Après la dissolution du carbonate de soude, la solution d'acide glycuronique est ajoutée à

la burette de telle façon que l'ébullition ne soit pas arrêtée. Vers la fin du titrage, la solution est ajoutée goutte à goutte en laissant s'écouler au moins dix secondes entre chaque addition. La complète disparition de la coloration bleue est prise comme terme final du virage. L'équivalent en acide glycuronique pour chaque centimètre cube de réactif de Bénédict est donné par un graphique établi expérimentalement par Quick.

Ce dosage par la méthode Bénédict n'est exact que pour des quantités relativement fortes. Lorsqu'il s'agit de déterminer les conjugués de l'urine normale par exemple, il est de toute nécessité d'utiliser des micro-méthodes. On peut employer celle de Folin et Wu (Quick) ou l'excellente technique de Shaffer et Hartmann [268].

On sait que cette méthode consiste en principe à chauffer la solution sucrée avec une liqueur cupro-alcaline spéciale et à doser ensuite par iodométrie l'ion cuivreux formé, en présence du sel cuivrique et d'oxalate de potasse. Cette liqueur a la formule suivante :

Sulfate de cuivre.....	5 gr.
Acide tartrique	7.50
Carbonate de sodium anhydre..	40 gr.
Iodure de potassium.....	10 gr.
Iodate de potassium.....	0.70
Oxalate de potassium.....	18.40
Eau q. s. p.	1.000 cc.

Cinq centimètres cubes de la solution à doser sont placés dans un gros tube à essai et additionnés d'égal volume du réactif précédent. Cette solution ne doit

pas contenir plus de deux milligrammes de substance réductrice. On place quinze minutes au bain-marie bouillant en ayant soin de recouvrir le tube, puis on refroidit complètement. On ajoute alors 5 cc. d'acide sulfurique normal, et on titre une minute plus tard avec une solution d'hyposulfite de sodium N/200, en présence d'empois d'amidon. On effectue une correction par un dosage à blanc. On calcule le cuivre réduit, sachant que 1 cc. de solution N/200 d'hyposulfite correspond à 0 milligr. 318 de cuivre. De ce chiffre on en déduit la quantité d'acide glycuronique en se reportant au tableau suivant dû à Scheff [256] et que nous reproduisons.

TABLEAU POUR LA CORRESPONDANCE
ENTRE LES POIDS DE CUIVRE ET D'ACIDE GLYCURONIQUE
(Méthode de SHAFFER et HARTMANN)

Acide glycuronique contenu dans cinq cm ³ de solution (mgr.)	Cuivre réduit (mgr.)
0,5	0,35
0,6	0,57
0,7	0,79
0,8	1,00
0,9	1,22
1,0	1,43
1,1	1,64
1,2	1,85
1,3	2,07
1,4	2,28
1,5	2,50
1,6	2,71
1,7	2,93
1,8	3,13
1,9	3,34
2,0	3,54

Nous allons passer rapidement en revue les différents temps de cette technique.

a) *Extraction du conjugué* : Le procédé à l'éther est certainement le plus utilisé et le plus convenable dans ce but. Sauer [267] l'a employé. Récemment, Soren Orskov [210] s'en est servi en utilisant l'appareil de Widmark [292]. Nasarjanz [189] a également constaté que cette technique d'isolement était satisfaisante. La plupart des glycuronides sont en effet solubles dans l'éther, de même que ceux qui existent normalement dans l'urine. De plus ce procédé est plus spécifique puisque les sucres et les autres substances réductrices habituelles sont insolubles dans l'éther. Lafargue dans sa thèse [156] a fait une étude de cette extraction pour les acides organiques de l'urine humaine. Il est évident que tous les acides solubles dans l'éther se trouveront dans ce liquide à côté de l'acide glycuronique. Il serait important de rechercher si leur présence n'introduit pas de causes d'erreurs.

b) *Hydrolyse du conjugué* : Celui-ci quantitativement isolé, il faut le dédoubler. Cette opération doit se faire d'une façon intégrale et avec le minimum d'action destructrice sur l'acide libéré. Link et Niemann [157] ont bien étudié l'action des acides minéraux dilués sur les acides uroniques. Pour éviter la destruction de ces derniers par décarboxylation il faut opérer dans certaines conditions qui sont relatives : 1° A la force de l'acide hydrolysant ; il doit être à une concentration supérieure à 2 p. 100 mais inférieure à 5 p. 100. La méthode de Quick utilisant l'acide chlorhydrique normal, c'est-à-dire à 3,65 p. 100, remplit

cette condition. 2° A la nature de l'acide ; il est préférable d'employer l'acide sulfurique à l'acide chlorhydrique. 3° A la température : à 100° l'action destructrice des acides minéraux même forts est très faible. 4° Enfin à la durée de l'hydrolyse : on peut sans aucun inconvénient prolonger cette opération une demi-heure. Quick a d'ailleurs vérifié sa méthode et a retrouvé aux erreurs d'expérience près, les quantités d'acide glycuronique ajoutées à l'urine.

c) *Détermination du pouvoir réducteur de l'acide* : Nous avons vu que Thierfelder croyait qu'une molécule d'acide glycuronique avait le même pouvoir réducteur qu'une molécule de glucose. Biberfeld [30] détermine le pouvoir réducteur par la macrométhode primitive de Bang utilisant l'hydroxylamine pour doser le sel cuprique en excès. Csonka [48] utilise un facteur obtenu par le rapport entre les poids moléculaires respectifs du glucose et de l'acide uronique. Quick [220] constate que soit le réactif de Bénédict soit celui de Folin et Wu, ne sont pas applicables à l'acide glycuronique dans les mêmes conditions qu'au glucose, ce qui l'oblige à les étalonner respectivement. Scheff [256] a expliqué toutes ces différences en montrant que l'acide glycuronique se comportait vis-à-vis des sels de cuivre d'une façon différente de celle du glucose et qu'aucune espèce de valeur numérique ne pouvait être calculée entre leur poids moléculaire et leur pouvoir réducteur. Il était donc nécessaire d'utiliser des tables de correspondance dressées empiriquement. Certains auteurs récents [210-189] ont utilisé la technique de Hagedorn et Jensen et l'ont appliquée au sang.

Il semble donc que l'on peut conclure que ce procédé de Quick constitue une technique très supérieure à celles utilisées auparavant. Tous les auteurs récents qui ont étudié la question, et en particulier Nasarjanz [189], Orskov [210], Winokurov [293], sont unanimes à reconnaître que le principe de la méthode de Quick est le meilleur pour l'établissement d'une technique de dosage des conjugués glycuroniques.

TROISIÈME PARTIE

Applications cliniques

Etat naturel

Métabolisme

L'étude biochimique de l'acide glycuronique et de la glycuconjugaion est encore à ses débuts. Le principal obstacle à ces recherches provient de l'insuffisance des méthodes analytiques. Aussi serons-nous très bref dans l'exposé de nos connaissances à ce sujet; assez peu de faits étant étayés sur des bases solides. Cependant à l'heure actuelle, depuis la découverte de techniques de dosage plus précises, de gros efforts sont faits par de nombreux chercheurs pour jeter plus de clarté sur ces problèmes, et certains faits intéressants sont dès maintenant acquis.

Applications cliniques

La détermination de la glycuronurie au cours de divers états pathologiques est de date relativement récente. Elle a donné lieu à de très nombreux travaux, en particulier en France, qui ont abouti à des conclusions contradictoires. Il ne faut pas s'en étonner si l'on songe aux méthodes d'analyse utilisées par les auteurs ; nous avons vu, en effet, que c'est seulement au cours de ces dernières années que l'on a pu mettre au point des techniques de dosage susceptibles de donner des approximations meilleures. Le trop petit nombre des recherches utilisant ces nouveaux pro-

cédés ne permet pas encore de conclure, mais il semble néanmoins que la détermination correcte de la glycuronurie pourrait constituer un test intéressant. Nous allons très brièvement résumer les principaux travaux sur la question.

I. — BASES PHYSIOLOGIQUES.

Les bases physiologiques sur lesquelles les premiers chercheurs ont fondé des applications à la clinique sont bien fragiles. Il semble ressortir des travaux d'Embden [58] signalés plus loin, que la combinaison d'une substance ingérée avec l'acide glycuronique se fait au niveau du foie. L'intégrité de la glande hépatique sera donc nécessaire pour assurer la glycuroconjugaison. Stejskal et Grünwald [269] en faisant ingérer du camphre à des malades, constatèrent que dans des cas de cirrhose du foie et d'ictère catarrhal, l'élimination de l'acide glycuronique était diminuée ou faisait complètement défaut. Ce travail paru en 1909 ne semble pas avoir attiré grandement l'attention des cliniciens. En 1913, Conzen [49] étudiant la glycuronurie dans le diabète, constate une augmentation énorme (jusqu'à 4 grammes environ), bien que dans certains cas de diabète avec acidose il ne peut pas déceler ce corps dans l'urine. L'ictère, la néphrite aiguë lui donnent une augmentation. Dans la cirrhose il trouve en général une glycuronurie normale ou faiblement diminuée, dans un cas cependant il la trouve nulle. En 1914, Medigreceanu [178] publie le résultat de ses recherches sur les variations de la gly-

curonurie au cours de la pneumonie. L'auteur constate une augmentation mais ne tire de cette épreuve aucune conclusion diagnostique ou pronostique. En 1915 commencent les travaux de H. Roger et de ses élèves. Celui-ci démontre d'abord expérimentalement qu'il existe une relation directe entre le pouvoir antitoxique du foie et sa fonction glycogénique ; un foie incapable de fixer le sucre est également incapable d'arrêter les poisons. Or le pouvoir glycuronopoiétique mesure une partie tout au moins de la fonction de défense de la cellule hépatique. Nous verrons que le rôle du foie dans la glycuconjugaison semble confirmé par des travaux récents.

II. — RÉSULTATS.

Une mise au point de la question jusqu'en 1923 a été faite par Schmid [254]. De l'ensemble des publications sorties de l'école de Roger, il se dégage que le taux de l'élimination glycuronique varie dans les différents états pathologiques. La glycuronurie persiste dans toutes les affections qui ne lèsent pas la cellule hépatique ; elle est au contraire abolie ou fortement diminuée dans les affections qui s'accompagnent d'insuffisance hépatique et elle s'exagère dans les maladies qui surexcitent la vitalité des cellules du foie.

Mais on sait que la glycuronurie physiologique peut varier sous des influences diverses n'offrant aucun rapport avec le foie (affections du tube digestif, foyers de suppuration [198], régime alimentaire) ; l'élimination est variable suivant les différentes heures de la journée

(Clogne et Fiessinger) [50]. Aussi pour se rendre indépendants de ces variations d'ailleurs faibles, Chiray et Caille [46] ont recours, à l'exemple de Stejskal et Grünwald, à ce qu'ils appellent l'épreuve de la glycuronurie provoquée, qui par administration de camphre élève le taux de l'acide glycuronique urinaire. Les applications cliniques ont été faites soit en étudiant les modifications spontanées, soit par le moyen de cette épreuve de surmenage.

Roger et Chiray trouvent une diminution puis une disparition de la glycuronurie spontanée et provoquée dans la cirrhose atrophique de Laënnec [240]. Elle serait nulle à la période ascitique, un ou deux jours après les ponctions elle pourrait apparaître passagèrement, pour redevenir normale dans les cirrhoses cliniquement guéries. Dans les ictères par rétention [241] la réaction à la naphtorésorcine serait plus marquée qu'à l'état normal. Après ligature du canal cholédoque, chez le chien et le lapin, ils ont observé les mêmes résultats.

Dans l'ictère catarrhal on observe, suivant Chiray et Texier [51], deux phases : glycuronurie forte, tout au début de l'ictère, diminuant pendant l'évolution de l'ictère pour devenir négative, puis glycuronurie reparaissant lentement dans les suites, au fur et à mesure que les fonctions hépatiques redeviennent normales.

Dans la pneumonie, ces auteurs distinguent trois phases : 1° Phase d'état, caractérisée par une hyperglycuronurie traduisant l'hyperactivité du foie (ce qui s'accorde avec les résultats de Médigreceanu) ; 3° La glycuronurie peut devenir négative au moment de la

crise ; 3° Phase post-critique dans laquelle l'élimination redevient lentement normale. D'après Fiessinger [74], la phase négative se comprend non plus en faisant intervenir une insuffisance hépatique, mais en admettant un épuisement des réserves glycogéniques sous l'influence de la maladie.

Etudiant la glycuronurie au cours de cancers à localisations diverses, H. Roger [242] trouve dans la réaction à la naphthorésorcine un élément important de pronostic : une réaction négative permet de porter un pronostic sévère ? Sur 46 cancéreux, trois seulement présentaient une réaction absolument normale. Cependant, Gauthier [102] a obtenu des résultats positifs dans des cancers à la période ultime.

Dans le diabète, Roger [243] [240] constate des réactions négatives. Il conclut que l'absence d'acide glycuronique dans les urines permet de différencier les glycosuries diabétiques des non diabétiques. Ces résultats doivent être pris avec prudence d'après ce que nous avons dit plus haut sur l'influence perturbatrice des sucres sur la réaction à la naphthorésorcine pratiquée suivant la technique de Roger. Nous avons vu les procédés préconisés pour la recherche dans les urines de diabétiques, recherches alors fréquemment positives. D'ailleurs cet auteur insiste lui-même, plus tard, sur cette cause d'erreur [244-245-246]. Enfin les travaux récents de Quick [225] démontrent que le chien dépancréaté est encore capable de produire l'acide glycuronique comme l'animal normal.

La recherche de l'acide glycuronique chez les enfants atrophiques a été faite par Barbier [32]. Elle

fournirait d'après lui des indications précieuses sur la fonction glycogénique du foie. Jean dans sa thèse [134] trouve que la glycuronurie est normale dans toutes les grossesses absolument normales, mais diminuée dans celles qui s'accompagnent de symptômes hépatiques. C'est un bon test du fonctionnement du foie chez les tuberculeux, d'après Fainsilber [75].

Ces études furent confirmées par de nombreux travaux. Citons les publications de Gauthier [102] dans lesquelles sont examinés des sujets sains, des diabétiques, des hépatiques et des cancéreux ; de R. Clogne et N. Fiessinger [50-74], qui ont vu la glycuronurie disparaître dans les gangrènes gazeuses, dans les septicémies graves, dans les ictères avec insuffisance hépatique, et dans les dysenteries cholériformes. Au contraire ils ont remarqué une élimination plus massive, chez des malades atteints de kyste hydatique du foie, d'ictère par rétention, d'abcès amibiens et d'hépatites dysentériques. Etienne et Benech [63] insistent sur l'importance de l'épreuve de la glycuronurie provoquée pour le diagnostic de l'insuffisance hépatique. J. Benech et Verain [33] concluent aussi à la grande valeur de cette épreuve.

Par contre, Lorenzani [158] trouve discutable l'emploi de la glycuronurie spontanée pour l'exploration fonctionnelle du foie. En utilisant la méthode de Roger modifiée dont nous avons parlé, Brûlé et ses collaborateurs [25] [26] trouvent la réaction fréquemment positive alors qu'elle était négative avec la technique primitive. Amer [5] dans sa thèse signale qu'il a constaté la réaction de l'acide glycuronique positive au cours des

affections hépatiques les plus graves. F. Schmid [254] a publié un important travail auquel nous avons souvent eu recours. Il emploie le menthol plutôt que le camphre et utilise le polarimètre comme procédé d'estimation approximative des variations de la glycuronurie provoquée. Après avoir expérimenté cette épreuve dans de multiples affections (ictère catarrhal, ictère grave, cirrhoses, tabès, tuberculose, cachexies, grossesses), il constate que la glycuronurie n'a jamais présenté la moindre différence quantitative entre les sujets sains et les sujets atteints d'affection hépatiques. Dans un cas mortel d'ictère grave, il a observé la persistance de l'acide glycuronique, jusqu'au moment où la sécrétion rénale s'arrêta complètement. Savy et Velluz [264] étudiant la méthode de Roger et de Brulé et la comparant à la détermination du coefficient de Maillard, sont arrivés aux mêmes conclusions. Pernet [216] dans sa thèse conclut que même avec la méthode Tollens-Roger, la recherche est fréquemment positive au cours d'affections hépatiques graves. Cependant ces auteurs ne mettent pas en cause le dosage, celui-ci, s'il était praticable d'une façon exacte, disent-ils, renseignerait peut-être sur l'état du foie.

C'est précisément cette hypothèse de travail qui a guidé certains chercheurs récents. Nous avons vu que Sauer [267] avait mis au point en 1930 une méthode de dosage de l'acide glycuronique urinaire qui sans être à l'abri de toute critique constituait un sérieux progrès. Il a appliqué sa méthode à la détermination de la glycuronurie au cours de certaines affections hépatiques.

On se rend compte par l'examen de ses résultats que les affections qui entraînent une insuffisance fonctionnelle du foie ont pour conséquence une diminution des valeurs glycuroniques. Dans les cas graves, l'épreuve au galactose est positive, mais dans les cas plus légers elle est négative, alors que la glycuronurie diminue. Ce dernier test serait par conséquent plus sensible, ceci est particulièrement net dans les cas d'ictère catarrhal. L'auteur conclut que si ses résultats se trouvaient confirmés sur une plus grande échelle, on pourrait admettre que toute valeur de la glycuronurie inférieure à 0 gr. 20 indiquerait une lésion hépatique.

Boku et Kin [34] étudiant l'urine de malades atteints d'affection du foie (55 cas), prétendent qu'elle contient très peu d'acide glycuronique et que l'administration de camphre ne produit pas d'augmentation. Des lapins empoisonnés par le phosphore montrent un abaissement considérable de l'excrétion d'acide camphoglycuronique. Ce dernier résultat a été confirmé par Nasarjanz [189].

III. — CONCLUSIONS.

Nous avons résumé dans ce qui précède la partie de l'histoire de l'acide glycuronique qui se révèle avec le maximum de résultats opposés. Que conclure de cet ensemble de recherches aussi contradictoires ? Nous pensons qu'avant d'interpréter les travaux des différents auteurs il est nécessaire d'avoir toujours présent à l'esprit la méthode d'analyse qu'ils ont utilisée. En

effet il est impossible de pouvoir porter un jugement définitif sur la valeur de l'épreuve de la glycuronurie spontanée ou provoquée tant que l'on ne pourra pas avoir à sa disposition une technique de dosage sûre et spécifique. La grande majorité des chercheurs ont employé la réaction à la naphtorésorcine, suivant la technique de Roger ou de Brulé par chauffage écourté. Nous avons exposé longuement les critiques concernant ces méthodes, nous n'y reviendrons pas. Il semble bien que cette étude clinique devrait être reprise en grande partie à l'aide de nouveaux procédés analytiques. La méthode de Sauer est beaucoup trop compliquée pour pouvoir être appliquée en clinique, nous avons vu que bien que donnant des approximations meilleures, elle demanderait à être vérifiée de façon plus précise; mais des méthodes dérivées de celles de Quick pourraient peut-être donner des résultats intéressants dans l'exploration de la fonction hépatique.

Etude des lésions du foie et des reins chez les animaux d'expériences, utilisés pour la production des conjugués.

Cette recherche avait été commencée avant nous par Fromm et Clemens [67] qui avaient constaté que le lapin pouvait supporter pendant longtemps une dose journalière de 5 grammes de menthol et de 2 grammes de bornéol sans troubles notables si ce n'est une faible rétention d'urine. Hämäläinen [110] a précisé qu'avec la même dose de bornéol on constatait

au bout d'un certain temps un amaigrissement notable. A la dissection on constatait la présence de petits foyers hémorragiques siégeant dans l'estomac et l'intestin grêle, et parfois quelques taches de dégénérescence graisseuse dans le foie.

L'animal que nous avons utilisé était une chienne, de taille moyenne, en état de gestation. Elle absorba des quantités de bornéol relativement énormes, voisines de un kilogramme, qui pouvaient réaliser une véritable intoxication. Cependant elle ne présenta jamais aucun trouble particulier, ni amaigrissement, ni rétention d'urine. Elle fut sacrifiée trois mois environ après l'accouchement. Peu de temps avant, nous analysions son urine. Nous n'avons constaté aucune variation des éléments normaux de ce liquide. Nous n'avons pas trouvé de glucose, ni de corps cétoniques, seulement des traces d'albumine ; ni pigments biliaires, ni acides biliaires, ni urobiline. L'autopsie ne révéla aucun changement dans l'aspect macroscopique des organes. Par contre l'examen microscopique montra diverses lésions.

Dans les préparations histologiques du foie colorées à l'hématéine-éosine, on constatait, en effet, au fort grossissement, que les cellules hépatiques étaient atteintes de dégénérescence graisseuse. Elles apparaissaient criblées de petites vacuoles circulaires claires, vides de leur contenu dissous au cours des manipulations. Les noyaux des cellules du foie étaient mal colorés et parfois même incolores. Les lésions de dégénérescence graisseuse se trouvaient uniformément réparties, mais certains territoires hépatiques en étaient

atteints avec une inégale intensité. On notait aussi la présence de très petits foyers hémorragiques au voisinage des espaces portes.

Les reins semblaient également atteints. Dans la cavité de certains corpuscules il existait des traces d'albumine coagulée. Les capillaires des glomérules de Malpighi étaient congestionnés. L'épithélium des tubes contournés paraissait à peu près normal, bien qu'à certains endroits on pouvait constater une légère dégénérescence graisseuse. Quant au pancréas il ne paraissait pas lésé.

Etat naturel

I. — DANS LE REGNE VEGETAL : LES POLYURONIDES

Pendant très longtemps on a considéré l'acide glycuronique comme l'apanage exclusif du règne animal, puis il fut découvert dans certaines productions végétales un peu analogues aux glucosides, mais c'est surtout dans les substances classées maintenant sous le terme de polyuronides qu'on l'a mis en évidence récemment.

Le premier exemple d'un composé glycuronique trouvé directement dans le règne végétal est la scutellarine. C'est un uronide simple qui se trouve dans l'extrait aqueux de la feuille du « *Scutellaria altissima* ». Goldschmiedt et Zerner [101] ont montré que c'est une combinaison de scutellaréine et d'acide glycuronique. La scutellaréine serait une tétra-oxyflavone. Dans les racines de la même plante on trouve un uronide très voisin, la baïcaline qui se dédouble en acide glycuronique et baïcaléine qui serait une trihydroxyflavone. Uiwa [285] put isoler à partir des racines fraîches du « *Scutellaria baïcalensis* » une enzyme, la baïcalinase qui dédouble les deux flavone-glycuronides. Nous avons déjà signalé le Buddleïa-uronide qui se

dédouble en propylpyrocatéchol et un acide uronique indéterminé [113].

Ces uronides simples sont rares, par contre il existe une grande quantité de polyuronides complexes qui ont été découverts par des auteurs récents. Il est curieux de remarquer que beaucoup de travaux actuels sur l'acide glycuronique ont été faits dans le domaine de la chimie végétale ; ils ont montré la distribution très large et la grande importance des acides uroniques dans les matières premières végétales. Ces polyuronides groupent ensemble les pectines, les gommes végétales, les hémicelluloses, les mucilages, certaines saponines ; on en trouve enfin dans plusieurs polysaccharides bactériens. On avait déjà reconnu aux premiers de ces corps des propriétés voisines, on sait maintenant qu'ils possèdent une structure chimique analogue.

Les publications relatives à ces questions sont encore trop peu nombreuses pour qu'on puisse se faire une idée d'ensemble ; nous serons obligés le plus souvent de citer des faits d'une façon fragmentaire. La constitution chimique exacte de toutes ces substances est encore loin d'être élucidée d'une façon complète, aussi nous bornerons-nous à signaler les principales recherches.

Néanmoins, il y a tout lieu de croire à l'heure actuelle que pour beaucoup de ces productions végétales on peut très schématiquement concevoir leur structure de la façon suivante : des acides uroniques formeraient un noyau fondamental constitué par un acide aldobionique, ou un polymère de cet acide au-

quel serait lié d'une façon plus lâche une série variable d'autres sucres.

Nous ne parlerons pas des pectines, dont la constitution, qui répond à ce schéma, est assez complètement connue, parce qu'elles renferment de l'acide galacturonique.

A. — GOMMES VÉGÉTALES

Les premiers chercheurs sur les gommés ayant montré que l'H et l'O de ces corps existent approximativement dans les mêmes proportions que dans l'eau, ces substances furent rangées dans le groupe des hydrates de carbone. Plus tard, par l'action des acides, plusieurs sucres furent obtenus par hydrolyse et les gommés furent, à la suite de ces travaux, classées parmi les polysaccharides. Il fut ensuite démontré qu'elles ne possédaient pas la structure des polysaccharides vrais, puisqu'on pouvait mettre en évidence plusieurs molécules de sucre unies à un noyau central possédant des propriétés acides. Cette union semblait être réalisée sous forme d'une liaison glucosidique, puisque la gomme existait à l'état de sel de calcium, de magnésium et de potassium.

Les recherches importantes sur la gomme arabe sont celles de Frémy [73], qui a montré que l'acide de cette gomme existe en partie à l'état libre, en partie à l'état de sels ; celles de Neubauer, qui signala aussi les propriétés acides, mais surtout celles de O'Sullivan [270]. D'après cet auteur, la gomme arabe serait un diarabane tétragalactane isogédrique ;

il isola une substance acide qu'il nomma acide gommique ou arabique.

Il faut arriver jusqu'en 1928 pour voir reprendre l'étude chimique de cette gomme. Cretcher et Butler [52], étudiant la nature de la substance acide formée au cours de l'hydrolyse de la gomme d'acacia isolèrent un acide aldobionique de formule $C^{12}H^{20}O^{12}$, contenant une fonction aldéhydrique et un groupe carboxyle. L'année suivante ils confirmèrent leurs premiers résultats [14].

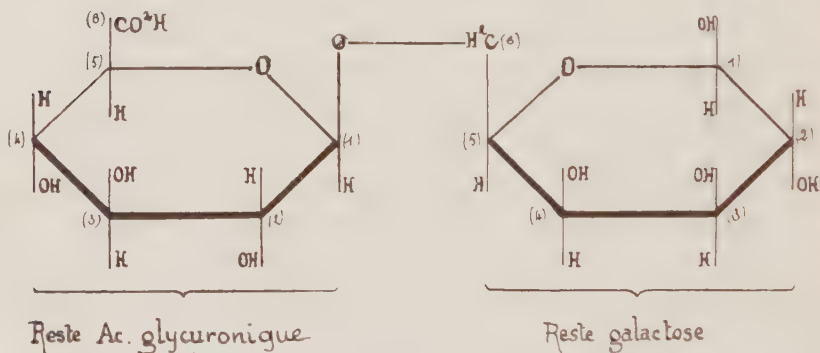
L'hydrolyse sulfurique d'une gomme de Cordofan leur fournit un acide formé d'une molécule de *d* galactose et d'une molécule d'acide *d* glycuronique. Les sucres présents dans les produits d'hydrolyse étaient le rhamnose, le *d* galactose et le l'arabinose. La molécule complète était constituée par l'association d'une molécule d'acide galactoglycuro-nique, deux molécules de galactose, trois molécules d'arabinose et une molécule de rhamnose. A. G. Norman [206₁] trouve des résultats analogues, mais il croit que les seuls sucres présents sont le *d* galactose et l'arabinose. De plus, il pense que l'on ne peut affirmer la présence de l'acide glycuronique, bien qu'il admette celle d'un acide uronique.

Heidelberger [121] et ses collaborateurs, au cours de leurs recherches sur la distribution des polysaccharides spécifiques chez les végétaux inférieurs, eurent l'idée de s'adresser aussi aux plantes supérieures. La gomme arabique leur fournit une substance acide douée de réaction de précipitation spécifique vis-à-vis de certains sérums antipneumococciques. Poursuivant

leurs études ils isolèrent [122] de la gomme arabique un acide aldobionique à l'état cristallisé, identique à celui de Butler et Cretcher.

Ces deux derniers auteurs fixèrent ensuite [35] la composition de l'arabane isolé de la gomme arabique par Salkowski. Ils démontrèrent que ce corps n'est pas un simple polymère de l'arabinose, mais qu'il contient, outre ce glucide, du galactose, du rhamnose et de l'acide glycuronique.

Enfin, Challinor, Haworth et Hirst [42] entreprirent l'étude chimique de l'acide aldobionique. Il possède la structure d'un acide galactoglycuronique, uni par l'intermédiaire du groupement aldéhydique de l'acide glycuronique avec la fonction alcool primaire du galactose. Sa formule est la suivante :



Il était donc définitivement démontré que le noyau fondamental de la gomme arabique était constitué par un acide aldobionique : l'acide galactoglycuronique.

Ce corps se présente sous la forme d'une poudre blanche ; il cristallise de ses solutions aqueuses, en

présence d'acétone, en petites aiguilles disposées en fuseaux. Il est soluble dans l'eau et dans l'alcool méthylique. Séché à l'air sec il fond à $+ 116^{\circ}$. Il présente une mutarotation manifeste en solution aqueuse, le pouvoir rotatoire spécifique variant d'une déviation initiale de $+ 12^{\circ}$ à un équilibre de $[\alpha]_D - 8^{\circ},5'$. On peut l'isoler sous forme de son sel de calcium $C^{24}H^{38}O^{24}Ca$, dont le pouvoir rotatoire est de $[\alpha]_D^{20} = +2^{\circ}$ en solution aqueuse. L. Amy [8] a étudié quelques propriétés physicochimiques de l'acide gommique ou arabique qui semble être un polymère de cet acide aldobionique.

Nous avons vu que Weinmann [288] a utilisé la gomme arabique comme matière première pour la préparation de l'acide glycuronique. Il a étudié les variétés lévogyres et dextrogyres, et parmi les gommages Nostras, la gomme du cerisier.

La composition de cette dernière a fait l'objet d'une étude récente de Butler et Cretcher [36]. L'hydrolyse acide la dédouble en huit molécules d'arabinose, six de xylose, six de galactose, trois de mannose et deux d'acide glycuronique. Le résidu de pentose est le premier hydrolysé, laissant un acide complexe contenant de l'acide glycuronique, du mannose et du galactose. Ensuite l'hydrolyse libère le galactose, laissant un complexe contenant seulement de l'acide glycuronique et du mannose. Ce noyau acide apparaît donc comme n'étant pas tout à fait identique à ceux de beaucoup d'autres gommages, puisqu'il contient deux molécules d'acide glycuronique pour une seule espèce de sucre au lieu d'une molécule d'acide pour une de

résidu sucré, comme c'est le cas pour les acides aldobioniques vrais. Ce noyau se rapprocherait donc par certains caractères de celui de la gomme adragante. Les auteurs prétendent que c'est la structure spéciale de cet acide qui est responsable de la spécificité microbienne et de la différenciation des gommes d'origine botanique différente.

D'autres gommes ont été étudiées. Anderson et Otis [9] ont déterminé la composition et la structure de la gomme mesquite. C'est une gomme produite par exsudation naturelle des branches et du tronc de l'arbre mesquite « *Prosopis juliflora* » et autres espèces qui croissent dans une grande partie du Texas, de l'Arizona et au nord de Mexico.

C'est un sel minéral d'un acide organique qui serait formé de quatre molécules d'arabinose, trois molécules de galactose et une d'acide méthoxyglycuronique avec élimination de sept molécules d'eau. Les études précises des auteurs ont montré que la fonction aldéhydique de l'acide méthoxyglycuronique est uni par le moyen d'une liaison glucosidique à un hydroxyle d'une molécule de galactose voisine ; les trois molécules de galactose étant liées entre elles d'une façon analogue. Ce noyau se montre résistant à l'hydrolyse ; il est uni par la fonction aldéhydique de la dernière molécule de galactose avec un groupement comportant quatre molécules d'arabinose qui semblent exister sous forme de chaîne linéaire, mais de telle sorte que tous les groupements aldéhydiques soient bloqués. Les auteurs proposent une formule développée.

Les gommés produites par diverses bactéries ont une structure générale analogue (Hopkins, Peterson et Fred [119] et [118]) à celle de la gomme arabique et contiennent aussi de l'acide glycuronique.

A. G. Norman [206₂] a consacré un travail à la gomme adragante. Après un historique des recherches précédentes, il étudie plus spécialement le constituant soluble qu'il propose de nommer tragacanthine. L'acide uronique est uni à l'arabinose sous forme d'une chaîne fermée constituant un noyau résistant à l'hydrolyse, tandis que le reste des sucres se trouve sous forme de chaîne latérale plus facilement hydrolysable.

La bassorine, constituant insoluble qui est beaucoup plus complexe, semble avoir une constitution analogue. Weinmann [289] admet que l'acide uronique de la gomme adragante, contrairement à ce qui existe dans la gomme arabique, est l'acide galacturonique. D'après Norman, son schéma, qui a beaucoup d'analogie avec celui adopté par Anderson et Otis, répondrait d'une façon évidemment grossière à la disposition générale des substances du groupe des gommés.

B. — MUCILAGES

On avait depuis longtemps remarqué que les substances désignées sous ce nom présentaient des propriétés analogues à celles des gommés. On sait aujourd'hui qu'elles possèdent une structure voisine.

Anderson et Crowder [10] étudiant le mucilage de

la graine de lin purent obtenir par hydrolyse un acide aldobionique formé d'une molécule d'acide *d* galacturonique et d'une molécule de *l* rhamnose. La molécule comprend une liaison glycosidique reliant le groupe aldéhydrique de l'acide *d* galacturonique et un groupe alcoolique du *l* rhamnose. La composition du mucilage de la graine de moutarde blanche « *brassica alba* » fut également élucidée par Bailey et Norris [37]. L'hydrolyse par la baryte solubilise du rhamnose, de l'arabinose, du galactose et de l'acide galacturonique. Le gel restant hydrolysé par la soude se dédouble en cellulose, arabinose, acides galacturonique et glycuronique. Le mucilage contiendrait des acides rhamno et galacto-uronique. Les auteurs pensent que les acides uroniques pourraient se former à partir des hexoses, grâce aux peroxydases avoisinant les cellules à mucilages.

Une constitution analogue a été trouvée dans le mucilage de la graine de coing par Renfrew et Cretcher [247]. Ils purent isoler de l'arabinose un mélange d'acides aldobioniques méthylés et non méthylés et une portion cellulosique. Les acides aldobioniques seraient constitués par un acide uronique et du xylose.

La caractérisation nette de l'acide uronique, en présence de sucres très voisins, est parfois un problème très difficile au point de vue chimique. Les hydrazines simples ou substituées donnent des mélanges. De même l'utilisation de l'oxydation par les techniques habituelles donnent des corps qui permettent de conclure aussi bien à la présence des sucres que des acides

uroniques dont ils dérivent. Une méthode très précieuse est celle employée par Heidelbergger et Goebel [123] utilisant l'action oxydante du brome et de l'acide bromhydrique qui, dans des conditions bien déterminées, transforment l'acide uronique en acide dicarboxylique, tandis que les sucres vrais sont convertis en acides monocarboniques correspondants. Donc si l'acide dicarbonique peut être identifié, la nature exacte de l'acide uronique est ainsi connue. D'autre part, pour identifier les sucres dans le cas, par exemple, des acides aldobioniques, on peut employer une méthode imaginée par Goebel [103] utilisant l'action oxydante de l'hypoiodite de baryum qui transforme dans certaines conditions l'aldohexose en acide monocarbonique correspondant sans toucher à l'acide uronique. Dans le cas de l'acide glycuronoglucose, par exemple, on obtient l'acide glycuronogluconique.

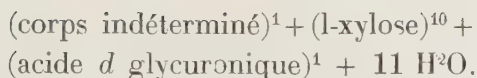
C. — HÉMICELLULOSES

Le terme d'hémicellulose fut d'abord proposé par Schulze [271] comme un nom de groupe pour toutes substances entrant dans la composition des membranes cellulaires végétales, qui, bien que sous certains rapports analogues à la cellulose, diffèrent nettement de celle-ci par leur solubilité dans les alcalis dilués et comparativement sont facilement hydrolysées par les acides minéraux dilués en donnant des pentoses et des hexoses.

Parmi les travaux récents sur leur constitution, citons ceux de Norris et Preece [207]. Pour ces auteurs,

il semble que les hémicelluloses sont en partie des matériaux de réserve et en partie des matériaux constitutifs des tissus de soutien végétaux. Les premiers étant plus riches en hexoses et les seconds en pentoses et acides uroniques. Une méthode générale de préparation et de purification des hémicelluloses du son de blé est donnée, ainsi que leurs fractionnements, en cinq parties physiquement et chimiquement distinctes qu'ils appellent hémicellulose A, B, B¹, B², C². La fraction B¹ contient du xylose et un acide uronique et la fraction C² de l'arabinose et un acide uronique qui semble être l'acide glycuronique.

Dans l'hémicellulose de la balle de maïs, Preece [218] retrouve une constitution analogue. Dans le bois de buis, le même auteur [219] isole une substance qu'il croit être l'acide xyloglycuronique. De son côté Anderson [11], étudiant le dégagement de gaz carbonique par les matières premières végétales et quelques hémicelluloses par l'action de l'acide chlorhydrique à 12 % à l'ébullition, conclut de ses recherches qu'il existe en général deux types d'hémicelluloses. Les unes contiennent des acides uroniques et sont ainsi des uronides des glucides, les autres n'en renferment pas. On peut souvent isoler par hydrolyse partielle à côté de sucres réducteurs des acides aldobioniques analogues à ceux trouvés dans les gommés végétales. Précisant ses recherches sur l'hémicellulose de l'enveloppe de la graine de coton, il put isoler avec Kinsman [12] une substance dont la constitution probable répond au schéma suivant :



Poids moléculaire probable : 1.800 à 2.000.

Les unions entre les trois corps seraient glucosidiques et l'union entre l'hémicellulose et la cellulose consisterait en une éthérification entre la fonction acide de l'acide uronique et un oxhydryle alcoolique de la cellulose.

On voit donc que toutes ces substances possèdent une structure schématique analogue et que la suggestion de Candlin et Schryver [41] de les ranger toutes dans une nouvelle classe, celle des polyuronides, est justifiée.

On a essayé de préciser les rapports qui unissent ces différents corps soit entre eux, dans le végétal, soit avec les lignines et la cellulose. Il n'est pas possible encore de conclure. Citons simplement l'étude de Sands et Gary [272] qui précisent la constitution de l'hémicellulose du bois mesquite. Cette substance isolée serait un mélange de deux polyxyloénométhoxyuronides. Il n'y aurait pas de relations suffisantes entre l'hémicellulose et la gomme mesquite, pour pouvoir supposer que l'une est le précurseur de l'autre.

D. — SAPONINES

Après Smolenski, l'étude de la saponine de la betterave à sucre a été reprise par Rehorst [237]. Cette saponine est une poudre blanche et amorphe facilement soluble dans l'alcool éthylique et méthylique, peu solu-

ble dans l'éther. Ce corps provoque immédiatement l'hémolyse du sang. Si on ajoute de la cholestérine, l'hémolyse n'est pas empêchée ; cette saponine ne donne pas, en effet, de combinaison avec la cholestérine. Elle est donc bien différente des saponines du type de la digitonine. Par hydrolyse au moyen de l'acide sulfurique dilué on obtient l'acide *d* glycuronique et la sapogénine. On a également signalé les saponines du « *Panax repens* » et de « *Aralia chinensis* » comme donnant aussi de l'acide glycuronique à l'hydrolyse.

E. — LES POLYURONIDES BACTÉRIENS

On sait qu'en 1917, Dochez et Avery démontrèrent la présence dans les jeunes cultures de pneumocoques de substances spécifiques non détruites par les ferments protéolytiques. Cette substance brute, fractionnée par Heidelberger et Avery, se montra composée principalement d'une substance glucidique. Elle donne les réactions de l'acide glycuronique et est précipitée presque quantitativement par l'antisérum correspondant.

La substance spécifique la plus étudiée est celle fournie par le pneumocoque type III. On peut, en la fractionnant, isoler un acide aldobionique $C^{14}H^{10}O^{10}COOH$. Heidelberger et Goebel [104] ont montré que c'était un composé d'acide glycuronique et de glucose combiné sous forme glucosidique de la manière habituelle. Le polyuronide spécifique du

bacille de Friedlander semble être un produit de condensation de deux molécules d'acide aldobionique et d'une molécule de glucose. L'acide aldobionique est indentique à celui du pneumocoque, mais la liaison acide glycuronique-glucose ne s'effectuerait pas sur le même carbone.

De très nombreux travaux ont été effectués sur ces substances, qui ont montré la multiplicité des polyuronides spécifiques des pneumocoques. On a de plus trouvé la présence de corps analogues dans certaines bactéries encapsulées et dans d'autres microbes. Au point de vue immunologique, cette découverte a permis de formuler une conclusion très importante. Le pouvoir antigénique et la spécificité des espèces microbiennes ne sont plus conditionnés comme on le croyait auparavant uniquement par des protéides. La spécificité de types est en effet attribuée aux glucides [286].

II. — DANS LE REGNE ANIMAL

A. — TISSUS DE SOUTIEN ANIMAUX

De même que nous venons de voir l'acide glycuronique constituant des tissus de protection et de soutien chez les végétaux, de même nous le retrouvons remplissant le même rôle chez l'animal.

Dans ces tissus animaux, on le rencontre à l'état de combinaison avec lui-même et avec des aminoglucides. Les muco et glucoprotéides dérivent en effet de la combinaison d'une substance protéique avec un grou-

pement prosthétique construit sur le modèle que nous venons d'indiquer (Blanchetière).

On le trouve surtout dans le cartilage sous forme d'acide chondroïtine sulfurique et dans la chitine des Crustacés et dans l'acide mucoïtine sulfurique.

Le premier corps se dédouble en acide sulfurique et chondroïtine laquelle s'hydrolyse avec libération d'un groupement acétyle et formation de chondrosine. Cette dernière enfin peut être dédoublée en acide glycuronique et chondrosamine qui est identique à la glucosamine. Levene qui a particulièrement étudié la constitution chimique de ces substances, admet pour la chondrosine une structure comportant deux molécules de glucosamine et deux molécules d'acide glycuronique. La chitosamine serait identique à la galactosamine. Nous renvoyons à l'excellente mise au point de Blanchetière [38] pour l'exposé détaillé de ces questions.

B. — LIQUIDES DE L'ORGANISME

Peu de travaux ont été faits récemment sur cette question. On trouvera l'historique détaillé des recherches dans la thèse de Bernier [18]. Jusqu'à aujourd'hui, l'acide glycuronique n'a jamais été trouvé à l'état libre dans l'organisme, mais toujours sous forme de conjugués. D'après les recherches de Mayer et Neuberger [174] on admet que l'acide glycuronique existe dans l'urine sous forme de conjugués phénolique, indoxylrique et scatoxylrique. Les opinions les plus contradictoires ont été soutenues au sujet de la valeur nor-

male de la glycuronurie ; les chiffres cités variant de 0 gr. 01-0 gr. 04 à 0 gr. 40-0 gr. 50. Deux travaux sont à retenir à ce sujet, c'est celui de Tollens et Stern [283], utilisant la méthode au furfurol après isolement à l'état de sel de plomb et surtout celui de Sauer [267] par extraction à l'éther et dosage du gaz carbonique. Le premier trouva comme élimination journalière moyenne 0 gr. 37 ; le second de 0 gr. 22 à 0 gr. 28. Nous avons vu que l'élimination glycuronique variait au cours de la journée. Nasarjanz [189] en utilisant l'extraction à l'éther et la détermination du pouvoir réducteur après hydrolyse a trouvé dans l'urine de chien 0 gr. 12 environ par 24 heures.

La présence de l'acide glycuronique dans l'urine étant intimément liée au problème des glucides de l'urine normale, de nombreux travaux ont été faits à ce sujet. Citons surtout les recherches récentes de Fleury et Ambert [71], de Bigwood [39], de Hassam et El-Aygahi [124], de West et Peterson [294], de Everett et Sheppard [64] (1934), etc... De nombreux auteurs pensent que, outre la faible quantité de glucose sécrétée normalement par le rein après les repas, on peut trouver dans l'urine normale un pentose et un sucre hydrolysable.

C'est P. Mayer [176] qui a montré la présence de l'acide glycuronique dans le sang de l'homme et du bœuf à l'aide de la combinaison avec la parabromophénylhydrazine. Lépine et Boulud [152] ont confirmé ces expériences et l'ont rencontré aussi dans le foie. Récemment, Orskov [210] en utilisant la méthode à l'extraction à l'éther et dosage par la technique de

Hagedorn a montré sa présence en petite quantité. Il trouve 0,40 milligramme % dans le sang humain et 0,55 milligramme dans le sang du chien.

Enfin la présence de cet acide uronique dans la bile et dans les fèces n'a pas été confirmée.

Métabolisme

On connaît fort peu de chose sur le métabolisme de l'acide glycuronique et de ses conjugués. L'insuffisance des méthodes analytiques employées n'a pas permis de poursuivre une expérimentation suffisamment exacte. Certains travaux récents ont cependant fourni quelques contestations intéressantes.

I. — LIEU DE FORMATION

Nous empruntons à Schmid [254] l'exposé des travaux antérieurs. On sait que c'est au cours de recherches sur la formation des sulfoconjugués dans le foie faites au moyen de la circulation artificielle que Embden [58] avait constaté la présence d'une plus grande quantité de phénol conjugué qu'il ne pouvait correspondre aux sulfoconjugués. Il put établir par la suite à l'aide de la réaction à la phloroglucine et à l'orcine que cet excès de phénol devait être conjugué à l'acide glycuronique. Il en conclut que le foie devait être un lieu de formation de l'acide glycuronique. P. Mayer contesta la valeur de ces résultats. Pohl pense que la formation de cet acide ne relève pas d'un mécanisme identique pour tous les conjugués. Quick [226] montre pour la conjugaison de l'acide benzoïque, que ni

la ligature du canal cholédoque, ni la fistule d'Eck ne modifient l'excrétion chez le chien. Par contre, l'anesthésie chloroformique diminue la formation d'acide glycuronique. Boku et Kin [34] constatent une diminution considérable de l'excrétion glycuronique dans l'empoisonnement phosphoré chez le lapin. Mais le travail récent le plus important est celui de Nasarjanz [189]. Cet auteur, étudiant expérimentalement le rôle du foie dans la synthèse des conjugués glycuroniques à l'aide des techniques de dosage par extraction à l'éther, réalisa une destruction du tissu hépatique chez l'animal. Il conclut que la synthèse des acides glycuroniques conjugués dans l'empoisonnement par le phosphore diminue d'une façon correspondante au degré de l'atteinte du parenchyme hépatique. Les transformations pathologiques des reins n'exercent aucune influence sur la synthèse de ces substances. Par contre, leur formation diminue d'une façon très brusque par l'anesthésie d'un lobe du foie. Ces dernières recherches semblent donc mettre en évidence le rôle de cette glande dans la glycuro-conjugaison.

II. — MÉCANISME DE PRODUCTION

Nous savons que l'absence d'acide glycuronique libre dans l'organisme animal ainsi que la difficulté de concevoir une oxydation de la fonction alcoolique primaire du glucose sans atteinte égale de la fonction aldéhyde avait conduit Fischer et Piloty [65] à émettre l'hypothèse suivante : la copule apte à la conjugaison glycuronique s'unirait au glucose pour former un glu-

coside ordinaire et c'est celui-ci qui à son tour serait oxydé en glycuronide correspondant.

Un certain nombre de faits plaident en faveur de cette hypothèse. Hildebrandt a, le premier, montré que divers glucosides naturels s'éliminaient à l'état de glycuronides. Hämäläinen a obtenu les mêmes résultats avec des glucosides synthétiques. Il a de plus montré que chez le lapin, après introduction de ces glucosides par voie sous-cutanée, on peut bientôt constater la présence de ceux-ci dans le sang mais non point la copule libre qui proviendrait de leur dédoublement alors que déjà l'urine contient les conjugués correspondants [70]. D'autre part, le fait que cet acide introduit dans l'organisme est éliminé en nature, montre qu'il ne participe pas à la synthèse des conjugués glycuroniques. Après injection d' α santenol et de glucose dans une anse intestinale isolée, chez un lapin, Hämäläinen [109] a pu trouver un α santenol glucoside dans le sang de la veine porte ; démontrant que la combinaison d'un alcool et du glucose s'opérait avant l'oxydation de ce dernier en acide glycuronique. De plus, la conjugaison semblait pouvoir s'effectuer au moins pour une part dans la paroi intestinale.

Cependant tous les glucosides ne se comportent pas d'une façon identique. C'est ainsi que la phloridzine se transforme dans l'organisme en un nouveau glycuronide à 6 atomes de carbone de plus. De même le chloralose, ainsi que l'a démontré Fredoux [70], se copule avec une nouvelle molécule d'acide glycuronique.

L'acide glycuronique dérive-t-il directement du glu-

cose ? Des expériences sur les animaux au jeûne ou phlorhidzinés n'ont pas apporté de précisions suffisantes sur le mécanisme de sa formation, ni sur ses rapports avec le métabolisme hydrocarboné ou protéique. Les recherches de Quick [225] montrent que le chien dépancréaté est encore capable de produire l'acide glycuronique comme l'animal normal. Cette production est accompagnée d'une diminution du sucre urinaire : l'acide glycuronique et le glucose auraient donc le même précurseur. Comme l'on admet que dans le diabète le glucose produit pendant le jeûne, dérive des protéines, l'organisme diabétique doit donc pouvoir utiliser encore la portion de la molécule protéique pour aboutir, non au glucose, comme à l'ordinaire, mais à la synthèse de l'acide glycuronique. Poursuivant ses recherches, cet auteur [227] croit pouvoir démontrer que le précurseur de l'acide glycuronique dérive plus facilement du glycogène et des aminoacides glycogéniques que du glucose.

On a étudié l'effet de l'ingestion d'un certain nombre d'acides aminés glycoformateurs sur l'élimination de l'acide glycuronique. Des différences notables furent constatées suivant la nature de ces corps. C'est ainsi que la glycine, l'alanine, l'arginine semblèrent provoquer une augmentation de l'excrétion glycuronique. Par contre la leucine, l'isoleucine, la cystine et l'acide glutamique eurent une influence douteuse. La valine, la phénylalanine et le tryptophane n'eurent aucun effet. Mais la tyrosine et l'histidine, pourtant non générateurs de sucre semblèrent exercer une influence décisive sur l'augmentation de l'élimination de l'acide

glycuronique (Adeline) [297]. Quick [228] montra que l'administration d'insuline augmente aussi d'une façon considérable cette élimination.

Le même auteur [229-230-231], dans ses recherches sur la β oxydation, étudia les relations de cet acide avec le métabolisme des lipides. Il admit que le stade initial dans le catabolisme des acides gras devait être une conjugaison d'un type analogue à celle des acides benzoïque et phénylacétique avec l'acide glycuronique.

Nous avons vu que pour que les molécules soient aptes à la conjugaison glycuronique il fallait qu'elles présentent une fonction alcoolique ou phénolique. Suivant les substances, cette opération a lieu avec des modalités différentes. Quick [232-233-234-222] étudia dans de nombreuses publications la conjugaison de l'acide benzoïque libre chez l'homme et chez les animaux et l'influence des substitutions les plus diverses dans ce noyau aromatique. Il proposa une nouvelle théorie de la détoxication.

III. — RÔLE DANS L'ORGANISME

Outre son intervention bien connue dans les mécanismes de détoxication, quel est le rôle de l'acide glycuronique dans l'organisme ? Est-ce une source d'énergie pour les organismes inférieurs ? Kay [146] montra que l'acide glycuronique peut être rapidement fermenté par un grand nombre d'organismes du groupe coli-typhique. Avec le *B. coli-communis* et le *B. lactis-aerogenes* on obtient également des produits de fermentation analogues à ceux obtenus à partir du

glucose. Pour Quick et Kahn [236] les membres du groupe coli-typhique et dysentériques peuvent utiliser l'acide glycuronique comme source d'énergie. Quelques microbes anaérobies, ainsi que l'*Aspergillus Niger*, le firent fermenter.

Injecté ou ingéré, il s'élimine en général en nature par les urines ; mais cette élimination n'est pas quantitative et Quick pense que l'acide glycuronique peut être utilisé, faiblement il est vrai, par l'organisme. Il n'a cependant aucune espèce d'influence sur les convulsions insuliniques qu'il est incapable d'améliorer.

Un travail de Howell [125] a montré la présence de cette substance dans l'Héparine. On sait qu'on désigne sous ce nom un composé anticoagulant isolé du foie par cet auteur. Ce serait une antiprothrombine. Howell a constaté que l'acide glycuronique libre n'avait pas d'action anticoagulante, mais que chauffé à 250° il se transformait en produit doué de propriétés anticoagulantes vis-à-vis du sang humain. Ces résultats infirmés en partie par certains auteurs ont été confirmés par d'autres. De plus, Fischer [76] a montré les relations étroites entre l'héparine et les globulines.

Enfin, Bierry [40], au cours de ses recherches sur le sucre protéidique, a récemment signalé qu'à un certain stade du clivage de ce composé (obtenu à partir des albumines plasmatiques) il était arrivé à isoler un dérivé hydrazinique particulier. Il réussit à préparer un corps donnant des réactions comparables à celles que l'on obtient avec une solution d'acide glycuronique pur. Par suite d'un accident, il ne lui a pas été

possible d'identifier encore avec exactitude cette substance.

Ces résultats sont intéressants mais il faut attendre de nouvelles recherches pour être fixé sur le rôle possible de l'acide glycuronique dans l'économie.

Résumé et conclusions générales

Il nous semble possible de résumer les principaux faits de cette étude générale dans les conclusions suivantes :

I. — Les méthodes de préparation de l'acide glycuronique sont nombreuses ; la plupart sont peu recommandables. Beaucoup ne permettent d'obtenir pratiquement que des solutions de cet acide.

II. — L'hydrolyse de l'acide aldobionique de la gomme arabique constituera vraisemblablement la méthode de l'avenir. A l'heure actuelle, elle n'est pas définitivement au point.

III. — Les modes de préparation utilisant la synthèse biologique sont incontestablement les plus importants. Le menthol glycuronide est obtenu d'une façon trop incertaine et avec un rendement trop insuffisant pour constituer une matière première intéressante.

IV. — Le bornéol est la meilleure substance glycurogénique. Nous avons exposé en détail les différentes phases de la préparation. La méthode de Hämäläinen nous a paru mauvaise, celle de Fromm donne des ren-

dements insuffisants. La technique de Quick par précipitation directe est la meilleure, mais n'est pas fidèle. Un procédé mixte au plomb nous a donné d'assez bons résultats. Cette méthode a l'avantage de fournir le conjugué, la lactone et l'acide.

V. — Ehrlich et Rehorst ont fixé les conditions qui permettent d'obtenir l'acide libre à l'état cristallisé. D'autre part, des techniques récentes semblent permettre la transformation de la lactone en acide.

VI. — Les principales propriétés de cette substance sont connues ainsi que sa structure qui est probablement pyranique. C'est le type des composés uroniques. La réaction à la naphtorésorcine appliquée à l'urine n'est pas spécifique.

VII. — La combinaison parabromophénylhydrazinique de Neuberg semble devoir être abandonnée pour la préparation de l'osazone du sel de baryum suivant Goldschmiedt et Zerner. Cette dernière représente avec la combinaison phénylhydrazinique le procédé de détection le plus sûr de l'acide glycuronique.

VIII. — Il n'existe pas de méthode de dosage vraiment contrôlée de cette substance dans les liquides biologiques. Deux techniques seulement peuvent prétendre à donner des approximations meilleures ; elles constituent cependant un progrès. Pourtant on ne peut pas juger de la valeur de l'épreuve de la glycuronurie.

IX. — L'acide glycuronique et plus généralement les acides uroniques se trouvent largement distribués

dans le règne végétal. Ce sont les constituants principaux des polyuronides, parmi lesquels il faut citer les gommes, les hémicelluloses, certaines saponines et les polyuronides bactériens.

X. — C'est un constituant des tissus de soutien animaux. En dehors de son intervention dans les mécanismes de détoxication, on connaît peu le rôle possible qu'il peut jouer dans l'organisme.

Vu :	LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
LE DOYEN,	A. LEULIER.
JEAN LEPINE.	

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 13 Avril 1934.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE.

Bibliographie

- [1] ASKENSTEDT (F. C.). — *Journ. Lab. Clin. Med.*, 1918, t. **3**, p. 300.
- [2] ABDERHALDEN (E.). — *Biochem. Handlexikon*, 1931, t. **13**. J. Springer, édit., Berlin.
- [3] ABDERHALDEN (E.). — *Biochem. Handlexikon*, t. **2**, p. 521 — t. **8**, p. 275 — t. **10**, p. 718 — t. **13**, p. 769.
- [4] ASAHINA (J.) et C. HASEGAWA. — *Journ. Pharm. Soc. Japan*, 1919, n° 448, pp. 484-489.
- [5] AMER (A.). — La recherche de la glycuronurie par la méthode de Tollens et ses difficultés techniques. *Thèse médecine*, Paris, 1925.
- [6] AOYAMA (S.). — *Journ. Pharm. Soc. Japan*, t. **49**, p. 100, d'après *Chem. Zentr.*, 1929.
- [7] AMBERT (P.). — Entraînement des sucres et des polyols par le sulfate de cuivre et la baryte. Contribution à l'étude du carbone indosé dans l'urine. *Thèse Pharm.*, Paris, 1929.
- [8] AMY (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, t. **10**, p. 1079.
- [9] ANDERSON (E.) et L. OTIS. — *Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. **52**, pp. 4461-70.
- [10] ANDERSON (E.) et J. A. CROWDER. — *Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. **52**, p. 3711.
- [11] ANDERSON (E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1931, t. **91**, p. 559.
- [12] ANDERSON (E.) et S. KINSMAN. — *Journ. of biol. Chem.*, 1931, t. **94**, p. 39.
- [13] BAEYER (A.). — *Lieb. Ann.*, 1870, t. **155**, p. 257.

- [14] BUTLER (C. L.) et L. H. CRETCHER. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1929, t. **51**, p. 1519.
- [15] BERGMANN (M.) et W. W. WOLFF. — *Ber. chem. Ges.*, 1923, t. **56**, p. 1060.
- [16] BRIDEL. — La structure des oses et des diholosides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, p. 1015.
- [17] BERGMANN (M.). — *Ber. chem. Ges.*, 1921, t. **54**, p. 1362.
- [18] BERNIER (R.). — Sur la présence de l'acide glycuronique dans l'urine normale. *Th. Pharm.*, Paris, 1910.
- [19] BANG (I.). — *Biochem. Ztschr.*, 1911, t. **32**, p. 445.
- [20] BOUTROUX. — *C. R. Ac. Sc.*, t. **102**, p. 924 — t. **104**, p. 369 — t. **111** p. 185.
- [21] BONANI (A.). — *Beiträge Ztschr. für physiol. und Path. Chem.*, 1902, t. **1**, p. 304.
- [22] BURKHART (B.), L. BAUR et K. P. LINK. — *Journ. of biol. Chem.*, 1934, t. **104**, p. 171.
- [23]¹ BIAL. — *Beiträge für Chem. und Phys.*, 1903, t. **2**, p. 532 — t. **3**, p. 528.
- [23]² BIAL. — *Zeit. für Physiol. Chem.*, 1905, t. **45**, p. 258.
- [23]³ BIAL. — *Biochem. Zentr.*, 1903, t. **1**, p. 664.
- [24] BERNIER (R.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1910, p. 401.
- [25] BRULÉ, DESTRÉES et VAN DOOREN. — *Bull. et Mémoires Soc. Médicale des Hôpitaux de Paris*, 9 mai 1924.
- [26] BRULÉ (M.), H. GARBAN et A. AMER. — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, t. **92**, n° 15, pp. 1216-18.
- [26] BRULÉ (M.), H. GARBAN et A. AMER. — *Presse Médicale*, 27 juin 1925, n° 51, p. 862.
- [27] BOULUD (R.). — Sur le dosage des matières sucrées contenues dans l'organisme et particulièrement dans le sang. *Th. Pharm.*, Lyon, 1903.
- [28] BIAL et HUBERT. — *Beiträge Zeit. Physiol. glyc. und Path.*, 1902, t. **2**, p. 532.
- [29] BOURQUELOT (E.) et H. HERISSEY. — *C. R. Ac. Sc.*, 1899, t. **129**, pp. 339-341.
- [30] BIBERFELD (J.). — *Biochem. Ztschr.*, 1914, t. **65**, p. 479.

- [31] BENEDICT (S. R.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1907, t. **3**, p. 101 — 1909, t. **5**, p. 485 — 1911, t. **9**, p. 57.
- [32] BARBIER. — *Soc. Médicale des Hôpitaux de Paris*, 1915, p. 1237.
- [33] BENECH (J.) et M. VERAÏN. — 14^e Congrès Français de Médecine, 12-14 octobre 1922.
- [34] BOKU (S.) et T. KIN. — *Journ. Chosen. Med. Assoc.*, 1931, t. **21**, pp. 67-68.
- [35] BUTLER (C. L.) et L. H. CRETCHER. — *Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. **52**, pp. 4509-4511.
- [36] BUTLER (C. L.) et L. H. CRETCHER. — *Amer. Chem. Soc.*, 1931, t. **53**, pp. 4160-67.
- [37] BAILEY (K.) et F. W. NORRIS. — *Biochem. Journ.*, 1932, t. **26**, p. 1609.
- [38] BLANCHETIÈRE (A.). — Les principes immédiats des êtres vivants, in *Traité de Physiologie Normale et Pathologique* de H. Roger et L. Binet, t. **1** — *Physiologie générale*, p. 719. Masson et Cie, édit., Paris, 1933.
- [39] BIGWOOD (E. J.). — *Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1932, t. **8**, p. 401.
- [40] BIERRY (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1932, t. **110**, p. 889.
- [41] CANDLIN (E. J.) et S. B. SCHRYVER. — *Proc. of the Roy. Soc. (série B)*, 1928, t. **103**, p. 365.
- [42] CHALLINOR (S. W.), W. N. HAWORTH et E. L. HIRST. — *Journ. of Chem. Soc.*, 1931, pp. 258-265.
- [43] CHIRAY (M.) et F. THIEBAUT. — *Les fonctions hépatobiliaires*. Masson et Cie, édit., Paris, 1930.
- [44] CAILLE (E.). — La glycuronie provoquée. *Th. Méd.*, Paris, 1921.
- [45]¹ CHOUCHEK (D.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1928, t. **186**, p. 520.
- [45]² CHOUCHEK (D.). — *Ann. Chim. Anal. et Chim. appliquée*, 1928, t. **10**, pp. 97-98.
- [45]³ CHOUCHEK (D.). — *Ann. Falsifications*, t. **21**, p. 198.

- [46] CHIRAY (M.) et E. CAILLE. — L'épreuve de la glycuronurie provoquée (méthode d'exploration fonctionnelle du foie). *Bull. Soc. Médicale des Hôpitaux de Paris*, 1921, p. 383.
- [47] CLAUSEN (S. W.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1922, t. **52**, p. 263.
- [48] CSONKA (F. A.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1924, t. **60**, p. 554.
- [49] CONZEN (F.). — *Ztschr. Klin. Med.*, t. **75**, p. 436.
- [50] CLOGNE (R.) et N. FIESSINGER. — *C. R. Soc. Biol.*, 16 déc. 1916.
- [51] CHIRAY (M.) et TEXIER. — *Bull. Soc. Méd. des Hôpitaux de Paris*, 18 juin 1915, p. 493.
- [52] CRETCHER (L. H.) et C. L. BUTLER. — *Science*, 1928, t. **68**, p. 116.
- [53] DICKSON (A. D.), H. OTTERSON et K. P. LINK. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. **52**, pp. 775-779.
- [54] DENIGÉS (G.). — *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, 1910, t. **50**, p. 292.
- [55] DENIGÉS (G.). — *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, 1923, t. **1**, p. 8.
- [56] DICKSON (A. D.), H. OTTERSON et K. P. LINK. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. **52**, pp. 775-779.
- [57] ERDMANN. — *Journ. für prakt. Chem.*, 1844, t. **33**, p. 190 — 1846, t. **37**, p. 385.
- [58] EMBDEN. — *Beiträge Zeit. Chem. Physiol. und Pathol* 1902, t. **2**, p. 591.
- [59] EHRLICH (F.) et K. REHORST. — *Ber. chem. Ges.*, 1925, t. **58**, p. 1989.
- [60] EHRLICH (F.) et K. REHORST. — *Ber. chem. Ges.*, 1929, t. **62**, p. 628.
- [61] EHRLICH (F.) et R. V. SOMMERFELD. — *Biochem. Ztschr.*, 1926, t. **168**, p. 263.
- [62] EHRLICH (F.) et F. SCHUBERT. — *Ber. chem. Ges.*, 1929, t. **62**, pp. 1974-2027.

- [63] ETIENNE (G.) et J. BENECH. — 14^e Congrès Français de Médecine, 12-14 octobre 1922.
- [64] EVERETT (M. R.) et F. SHEPPARD. — *Journ. of biol. Chem.*, 1930, t. **87** (Proc. XXXV) — 1932, t. **96**, p. 431.
- [64] EVERETT (M. R.), B. G. EDWARDS et F. SHEPPARD. — *Journ. of biol. Chem.*, 1934, t. **104**, p. 11.
- [65] FISCHER (E.) et O. PILOTY. — *Ber. chem. Ges.*, 1891, t. **24**, p. 521.
- [66] FISCHER (E.). — *Ber. chem. Ges.*, t. **22**, p. 2204.
- [67] FROMM (E.) et P. CLÉMENS. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1901-1902, t. **34**, p. 385.
- [68] FROMM (E.) et P. CLÉMENS. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1902, t. **34**, p. 385.
- [69] FLÜCKIGER. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, t. **9**, p. 351.
- [70] FRÉDOUX (M.). — Etude de la destinée du chloralose dans l'organisme animal et ses rapports avec la conjugaison glycuronique. *Th. Pharm.*, Paris, 1914.
- [71] FLEURY (P.) et P. AMBERT. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1930, t. **12**, p. 350.
- [72] FRAISSE. — *Th. Pharm.*, Lyon, 1906-1907.
- [73] FRÉMY. — *C. R. Ac. Sc.*, t. **50**, p. 124.
- [74] FIESSINGER (N.) et H. WALTER. — *L'exploration fonctionnelle du foie et l'insuffisance hépatique*. Masson et Cie, édit., Paris, 1925.
- [75] FAINSILBER (T.). — *Th. Méd.*, Paris, 1917.
- [76] FISCHER (A.). — *Biochem. Ztschr.*, 1932, t. **244**, p. 464.
- [77] GRAEBE. — *Lieb. Ann.*, 1889, t. **254**, p. 274.
- [78] GOODYEAR et HAWORTH. — *Journ. of Chem. Soc.*, 1927, p. 136.
- [79] GOEBEL (W. F.) et F. H. BABERS. — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, t. **100**, pp. 743-748.
- [80] GOEBEL (W. F.) et F. H. BABERS. — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, t. **100**, p. 573.
- [81] GEORGESCU (J. D.). — *Th. Science*, Paris, 1932.

- [82] GEORGESCU (J.). — *Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1932, pp. 122-126.
- [83] GOLDSCHMIEDT (G.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1910, t. **65**, pp. 389-93.
- [84] GOLDSCHMIEDT (G.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1910, t. **67**, p. 194.
- [85] GUNTHER, DE CHALMOT et TOLLENS. — *Ber. chem. Ges.*, 1890, t. **23**, p. 175 — 1892, t. **25**, p. 2569.
- [86]¹ GIEMSA (G.). — *Ber. chem. Ges.*, 1900, t. **33**, p. 2996.
- [86]² GIEMSA (G.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1904, t. **41**, p. 548.
- [87] GOLDSCHMIEDT (G.) et F. ZERNER. — *Monatsh. für Chem.*, 1912, t. **33**, p. 1217.
- [88] GOEBEL (W. F.) et F. H. BABERS. — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, t. **100**, pp. 743-748.
- [89] GOEBEL (W. F.) et F. H. BABERS. — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, t. **101**, p. 173.
- [90] GUIART (J.) et L. GRIMBERT. — *Précis de diagnostic chimique, microscopique et parasitologique*, 4^e édit. 1922. L. Lamarre, édit., Paris.
- [100] GOLDSCHMIEDT (G.) et E. ZERNER. — *Ber. chem. Ges.*, 1913, t. **46**, p. 113.
- [101] GOLDSCHMIEDT (G.) et E. ZERNER. — *Monatsh. für Chem.*, 1910, t. **31**, pp. 439-489.
- [102] GAUTHIER (P.). — *Presse Médicale*, 1916, n° 43, p. 339.
- [103] GOEBEL (W. F.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1927, t. **72**, p. 801.
- [104] HEIDELBERGER (M.) et W. F. GOEBEL. — *Journ. of biol. Chem.*, 1927, t. **74**, p. 613.
- [105] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL (F. E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1929, t. **84**, p. 639.
- [106] HAWORTH (W. N.) et E. L. HIRST. — *Journ. of Chem. Soc.*, 1926, p. 1858.
- [107] HAWORTH (W. N.), E. L. HIRST et NICHOLSON. — *Journ. of Chem. Soc.*, 1927, p. 1513.

- [108] HAMALAINEM (J.) et L. SJOSTROM. — *Skand. Arch. für Physiol.*, t. **24**, p. 113.
- [109] HAMALAINEM (J.). — *Skand. Arch. für Physiol.*, t. **30**, p. 196.
- [110] HAMALAINEM (J.). — *Skand. Arch. für Physiol.*, 1910, t. **23**, p. 86 et p. 297.
- [111] HERVIEUX (Ch.). — Recherches biochimiques sur l'indol et l'acide glycuronique. *Th. Sciences*, Paris, 1908.
- [112] HOPPE, SEYLER et THIERFELDER. — *Handbuch der physiologisch und pathologisch Chemischen Analyse*. Neunte Auflage J. Springer, édit., Berlin, 1924.
- [113] HSIEH (M.) YU. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, t. **15**, p. 616.
- [114] HERVIEUX (Ch.). — *Th. Sciences*, Paris, 1908, p. 117 et p. 118.
- [115] HAAR (Van der A. W.). — *Anleitung zur Nachweiss, zur Trennung und Bestimmung der Monosaccharide und Aldehydsäuren*. Borntraeger, édit., Berlin, 1920.
- [116] HUPPERT. — *Analyse der Harns*, 10^e édit., 1898, p. 197.
- [117] HAAR (Van der A. W.). — *Biochem. Ztschr.*, 1918, t. **88**, p. 205.
- [118] HOPKINS (E. W.), W. H. PETERSON et E. B. FRED. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1931, t. **53**, p. 306.
- [119] HOPKINS (E. W.), W. H. PETERSON et E. B. FRED. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. **52**, p. 3659.
- [120] HAENDEL (M.). — *Rev. asoc. med. Argentina*, 1929, t. **42**, p. 215.
- [121] HEIDELBERGER (M.), T. AVERY et W. F. GOEBEL. — *Journ. of exp. Med.*, 1929, t. **49**, p. 847.
- [122] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL. — *Journ. of biol. Chem.*, 1929, t. **84**, p. 639.
- [123] HEIDELBERGER (M.) et W. F. GOEBEL. — *Journ. of biol. Chem.*, 1927, t. **74**, p. 616.

- [124] HASSANS (A.) et M. A. S. EL-AYGACHI. — *Biochem Journ.*, 1932, t. **26**, p. 1851.
- [125] HOWELL (W. H.). — *Bull. of the John Hopkins Hosp.*, 1928, t. **42**, p. 201.
- [126] ISHIDATE (M.). — *Journ. Pharm. Soc. Japan*, 1929, t. **49**, p. 56.
- [127] JAFFÉ (M.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1878, t. **2**, p. 47.
- [128] JOLLES (A.). — *Monatsh. für Chem.*, 1911, t. **32**, p. 623.
- [129] JOLLES (A.). — *Biochem. Ztschr.*, 1911, t. **34**, p. 242.
- [130] JACOBSON (K. P.) et A. DA CRUZ. — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, t. **104**, p. 431.
- [131] JOLLES (A.). — *Ber. Pharm. Ges.*, 1909, t. **19**, pp. 477-490.
- [132] JOLLES (A.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, t. **81**, pp. 203-204.
- [133] JOLLES (A.). — *Ber. chem. Ges.*, 1912, t. **45**, p. 3280.
- [134] JEAN. — *Glycuronurie et grossesse. Th. Med.*, Paris, 1915.
- [135] KILIANI. — *Ber. chem. Ges.*, t. **20**, p. 2710.
- [136] KILIANI (H.). — *Ber. chem. Ges.*, 1925, t. **58**, pp. 2344-2362.
- [137] KILIANI (H.). — *Ber. chem. Ges.*, 1921, t. **54**, pp. 456-472.
- [138] KÜLZ. — *Ztschr. für Biol.*, t. **23**, p. 476.
- [139] KILIANI (H.). — *Ber. chem. Ges.*, 1922, t. **55**, p. 75.
- [140] KITASATO (T.) et C. NEUBERG. — *Biochem Ztschr.*, 1929, t. **207**, p. 230.
- [141] KILIANI (H.). — *Ber. chem. Ges.*, 1926, t. **59**, pp. 1469-1477.
- [142] KOTAKE. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, t. **45**, p. 320.
- [143] KNECHT (E.) et E. HIBBERT. — *Journ. of Chem. Soc.*, 1925, t. **127**, pp. 2854-60.
- [144] KRAFT. — *Apoth. Zeit.*, 1906, p. 611.
- [145] KÜLZ. — *Pflüger's Arch.*, t. **28**, p. 506.

- [146] KAY. — *Biochem. Journ.*, 1926, t. **20**, p. 321.
- [147] LEERSUM (Van). — *Beiträge chem. Phys. und Pathol.*, 1904, t. **5**, p. 510.
- [148] LEVENE et LOPEZ-SUAREZ. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1918, t. **36**, p. 118.
- [149] LIEBSCHLAG (E.). — *Arch. path. Anat.* (Virchow), 1921, t. **230**, p. 179.
- [150] LEVENE (P. A.) et G. M. MEYER. — *Journ. of biol. Chem.*, 1924, t. **60**, p. 175.
- [151] LÉPINE (R.) et R. BOULUD. — *C. R. Ac. Sc.*, 1903, t. **136**, p. 1037 — 1904, t. **138**, p. 610 — 1906, t. **142**, p. 197 — 1909, t. **148**, p. 453.
- [152] LÉPINE (R.) et R. BOULUD. — *C. R. Ac. Sc.*, 1901, t. **133**, p. 138.
- [153] LEVENE (P. A.) et F. B. LA FORGUE. — *Journ. of biol. Chem.*, 1913, t. **15**, p. 74.
- [154] LEFÈVRE (K. U.) et B. TOLLENS. — *Ber. chem. Ges.*, 1908, t. **40**, p. 4513.
- [155] LEFÈVRE (K. U.). — *Th. d'après H. Meyer* (voir n° 177).
- [156] LAFARGUE (J. M.). — *Th. Pharm.*, Bordeaux, 1932.
- [157] LINK (K. P.) et C. NIEMANN. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1930, t. **52**, p. 2474.
- [158] LORENZANI (G.). — *Il policlinico*, 1920, t. **27**.
- [159] MUSCULUS et DE MERMÉ. — *C. R. Ac. Sc.*, 1875, t. **80**, p. 958.
- [160] MERING (Von) et MUSCULUS. — *Ber. chem. Ges.*, 1875, t. **8**, p. 662.
- [161] MERING (Von). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1882, t. **6**, p. 480.
- [162] MAQUENNE (L.). — *Les sucres et leurs principaux dérivés*. Carré et Naud, édit., Paris, 1900.
- [163] MEYER (A.) et J. JEANNIN. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, t. **13**, p. 542.
- [164] MORELL (S.). — Thésis University of Wisconsin, 1931, d'après *Journ. of biol. Chem.*, 1934, t. **104**, p. 202.

- [165] MAGNUS LÉVY (A.). — *Biochem. Ztschr.*, 1907, t. **2**, p. 319.
- [166] MAYER et NEUBERG. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1900, t. **29**, p. 256.
- [167] MANN et TOLLENS. — *Lieb. Ann.*, 1896, t. **290**.
- [168] MIWA (TOMOO). — *Acta Phytochim.*, 1932, t. **6**, pp. 155-171.
- [169] MOLISCH. — *Monatsh. Chem.*, 1886, t. **7**, p. 198.
- [170] MANN et TOLLENS. — *Lieb. Ann.*, 1896, t. **290**, p. 157.
- [171] MAYER (P.). — *Ztschr. für Klin. Med.*, 1902, t. **47**, p. 79.
- [172] MANDEL (J. A.) et C. NEUBERG. — *Biochem. Ztschr.*, 1908, t. **13**, p. 148.
- [173] MAYER (P.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1901, t. **32**, p. 529.
- [174] MAYER (P.) et C. NEUBERG. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1900, t. **29**, p. 256.
- [175] MAYER (P.). — *Deutsche med. Wochenschrift*, 1901, t. **27**, p. 243.
- [176] MAYER (P.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1901, t. **32**, p. 518.
- [177] MICHAELIS. — *Ber. chem. Ges.*, 1893, t. **26**, p. 2190, d'après H. Meyer : *Analyse et détermination de la constitution des composés organiques*, 1^{re} édit. française, A. Michel, édit., Paris, 1924, t. **2**, p. 788.
- [178] MEDIGRECEANU (F.). — *Studies of Rockefeller Institute*, 1914, t. **19**, p. 536.
- [179] MOREL et FRAISSE. — *Bull. Soc. Chim.*, 1907, t. **1**, p. 659.
- [180] MANN (F.), M. KRÜGER et B. TOLLENS. — *Ztschr. angew. Chem.*, 1896, 33.
- [181] NANJI (D. R.), F. J. PATON et A. R. LING. — *Journ. of Chem. Soc. Ind.*, 1925, t. **44**, p. 253, 8 T.
- [182] NEUBERG (C.) et S. LACHMANN. — *Biochem. Ztschr.*, 1910, t. **24**, p. 476.

- [183] NIEMANN (C.) et H. P. LINK. — *Journ. of Biol Chem.*, 1934, t. **104**, p. 195.
- [184] NELSON (W. L.) et L. H. CRETCHER. — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1929, t. **51**, p. 1914.
- [185] NIEMANN (C.), S. KARJOLA et H. P. LINK. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1934, t. **104**, p. 189.
- [186]¹ NIEMANN (C.) et H. P. LINK. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, t. **95**, p. 203.
- [186]² NIEMANN (C.) et H. P. LINK. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, t. **100**, p. 408.
- [187] NIEMANN (C.), E. SCHOEFFEL et K. P. LINK. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, t. **101**, p. 337.
- [188] NEUBERG (C.) et S. LACHMANN. — *Biochem. Ztschr.*, 1910, t. **24**, p. 416 à 422.
- [189] NASARJANZ (B. A.). — *Ztschr. ges. exper. Med.*, 1932, t. **80**, p. 11 à 17.
- [190] NEUBERG (C.) et M. KOBEL. — *Biochem. Ztschr.*, 1931, t. **243**, p. 435.
- [191] NEUBERG (C.). — *Ztschr. für physiolo. Chem.*, 1901, t. **31**, p. 564.
- [192] NICOLAS. — *C. R. Soc. Biol.*, 1906, t. **61**, p. 149.
- [193] NEUBERG (C.). — *Ber. chem. Ges.*, 1899, t. **32**, pp. 2395 3384 et 1900, t. **33**, p. 3315.
- [194] NEUBERG (C.). — *Ber. chem. Ges.*, 1899, t. **32**, p. 2395.
- [195] NEUBERG (C.) et W. NEIMANN. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1905, t. **44**, p. 97.
- [196] NEUBERG (C.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1900, t. **33**, p. 3317.
- [197] NEUBERG (C.) et NEIMANN. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1905, t. **44**, p. 114.
- [198] NEUBERG (C.). — *Der Harn*, t. **1**, pp. 439 et 451 J. Springer, Berlin, 1911.
- [199] NEUBERG (C.). — *Biochem. Ztschr.*, 1910, t. **24**, p. 423.
- [200] NEUBERG (C.) et SANEYOSHI. — *Biochem. Ztschr.*, 1911, t. **36**, p. 56.
- [201] NEUBERG (C.) et O. SCHEWKET. — *Biochem. Ztschr.*, 1912, t. **44**, pp. 502-504.

- [202] NIEMANN (C.), E. SCHOEFFELL et K. P. LINK. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, t. **101**, p. 337.
- [203] NEUBERG (C.). — *Ergebnisse der Physiologie*, 1904, t. **3**, p. 392.
- [204] NAIDUS. — *Ref. in Bio. Zentralblatt.*, 1903, t. **1** p. 258.
- [205] NEUBERG (C.) et NEIMANN. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1905, t. **44**, p. 127.
- [206]¹ NORMAN (A. G.). — *Biochem. Journ.*, 1929, t. **23**, p. 524.
- [206]² NORMAN (A. G.). — *Biochem. Journ.*, 1931, t. **25**, p. 200.
- [207] NORRIS (F. W.) et I. A. PREECE. — *Biochem. Journ.*, 1930, t. **24**, p. 59.
- [208] OHLE (H.). — *Die Chemie der Monosaccharide und der glykolyse*, Munich, 1931, p. 113, d'après *Journ. Biol. Chem.*, 1934, t. **104**, p. 195.
- [209] OGATA (A.) et T. YAMANOUCHI. — *Journ. Pharm. Soc. Japan*, 1929, t. **49**, pp. 541-556.
- [210] ORSKOV (Søren L.). — *Skand. Arch. Physiol.*, 1932, t. **63**, p. 255.
- [211] PRYDE (J.) et R. T. WILLIAMS. — *Biochem. Journ.*, 1933, t. **27**, p. 1205.
- [212] PRYDE (J.) et R. T. WILLIAMS. — *Nature*, 1931, pp. 128-187.
- [213] PRYDE (J.) et R. T. WILLIAMS. — *Biochem. Journ.*, 1933, t. **27**, p. 1197.
- [214] PELLACANI (P.). — *Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1883, t. **17**, p. 369.
- [215] PRYDE (J.) et R. T. WILLIAMS. — *Biochem. Journ.*, 1933, t. **27**, p. 1210.
- [216] PERNET (E.). — Contribution à l'étude de la glycururie dans l'insuffisance hépatique. *Th. Méd.*, Lyon, 1927.
- [217] PERVIER (N. C.) et R. A. GARTNER. — *Ind. and Ing. Chem.*, 1923, t. **15**, p. 1167.
- [218] PREECE (I. A.). — *Biochem. Journ.*, 1930, t. **24**, p. 973.

- [219] PREECE (I. A.). — *Biochem. Journ.*, 1931, t. **25**, p. 1304.
- [220] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1924, t. **61**, pp. 668-677.
- [221] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1927, t. **74**, p. 331.
- [222] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, t. **97**, p. 403.
- [223] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1926, t. **69**, p. 549.
- [224] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1924, t. **61**, pp. 668-677.
- [225] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1926, t. **70**, pp. 59 à 69.
- [226] QUICK (A. J.) et M. A. COOPER. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, t. **99**, p. 119.
- [227] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1926, t. **70**, p. 390.
- [228] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, t. **98**, p. 537.
- [229] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1928, t. **77**, p. 581.
- [230] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1928, t. **80**, p. 515.
- [231] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1928, t. **80**, p. 527.
- [232] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1931, t. **92**, p. 65.
- [233] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, t. **95**, p. 189.
- [234] QUICK (A. J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, t. **96**, p. 83.
- [236] QUICK (A. J.) et M. C. KAHN. — *Journ. Bact.*, 1929, t. **18**, p. 133.
- [237] REHORST (K.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1929, t. **62**, p. 519.
- [238] ROBERTSON (A.) et B. R. WATERS. — *Journ. of Chem. Soc.*, 1931, p. 1709.

- [239] ROGER (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1915, t. **75**.
- [240] ROGER (H.) et M. CHIRAY. — *Bull. Ac. Méd. Paris*, 15 avril 1915.
- [241] ROGER (H.) et M. CHIRAY. — *Bull. Soc. Méd. Hôpitaux de Paris*, 30 avril 1915.
- [242] ROGER (H.). — *Soc. Méd. Hôpitaux de Paris*, 18 juin 1915, p. 499.
- [243] ROGER (H.). — *Soc. Méd. Hôpitaux de Paris*, 30 juillet 1915.
- [244] ROGER (H.). — *Bull. Soc. Méd. Hôpitaux*, 1915, p. 1244, discussion.
- [245] ROGER (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 18 déc. 1915, p. 714.
- [246] ROGER (H.). — *Presse Médicale*, 1916, n° 28, p. 217.
- [247] RENFREW (A. G.) et L. H. CRETCHER. — *Journ. of biol. Chem.*, 1932, t. **97**, p. 503.
- [248] SCHMIEDEBERG (O.) et H. MEYER. — *Ztschr. für physiol Chem.*, 1879, t. **3**, p. 422.
- [249] SPIEGEL (A.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1882, t. **15** (II), p. 1964.
- [250] STENHOUSE (J.). — *Lieb. Ann.*, 1844, t. **51**, p. 423.
- [251] SCHMIDT (W.). — *Lieb. Ann.*, 1855, t. **93**, p. 83.
- [252] SOHST et TOLLENS. — *Lieb. Ann.*, t. **245**, p. 1.
- [253] SMOLENSKI (K.). — *Roelniki Chemji*, 1924, t. **3**, p. 153-164.
- [254] SCHMID (F.). — *Ann. Med.*, 1923, t. **13** (I), p. 328.
- [255] SWARTZ (K.-T.) et C. O. MILLER. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, t. **103**, p. 651.
- [256] SCHEFF (G.). — *Biochem. Ztschr.*, 1928, t. **194**, p. 96-104.
- [257] SCHEFF (G.). — *Biochem. Ztschr.*, 1927, t. **183**, p. 341-349.
- [258] SALKOWSKI. — *Berlin. Klin. Wochenschr.*, 1895, n° 17.
- [259] SCHIFF. — *Ber. Chem. Ges.*, 1888, t. **20**, p. 540.
- [260] SCHMIDT (E.) et F. VOCKE. — *Ber. Chem. Ges.*, 1926, t. **59**, p. 1585, 1588.

- [261] SCHEWKET (O.). — *Biochem. Ztschr.*, 1913, t. **55** p. 3.
- [262] STEPP (W.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1919, t. 107, p. 264.
- [263] STEPP (W.) et F. DIEBSCHLAG. — *Deut. Archiv. Klin. Med.*, 1921, t. **136**, p. 66.
- [264] SAVY (P.) et L. VELLUZ. — *Journ. de Méd. de Lyon*, 1926, 5 juin.
- [265] SCHMIDT (E.), K. MEINEL et E. ZINTL. — *Ber. Chem. Ges.*, 1927, t. **60**, p. 503.
- [266] SCHWALBE (C. G.) et G. A. FELDTMANN. — *Ber. Chem. Ges.*, 1925, t. **58**, p. 1534.
- [267] SAUER (J.). — *Klin. Wochenschrift*, 1930, t. **9**, p. 2350-2351.
- [268] SHAFER (P. A.) et A.-F. HARTMANN. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1920-1921, t. **45**, p. 365.
- [269] STGSKAL et GRÜNWARD. — *Wien. Klin. Wochenscr.*, 1909, t. **30**, p. 1602.
- [270] SULLIVAN (O.). — *Journ. of Chem. Soc.*, 1884, t. **45**, p. 41, et *Proc. Chem. Soc.*, 1889, t. **45**, p. 166.
- [271] SCHULTZE (E.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1891, t. 24, p. 2285.
- [272] SANDS (L.) et W. J. GARY. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, t. **101**, p. 573.
- [273] THIERFELDER (H.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1887, t. **11**, p. 388.
- [274] THIERFELDER (H.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1889, t. **13**, p. 275.
- [275] TAKAHASHI (T.) et T. ASAI. — *Proced. of the Imp. Acad. of Tokyo*, 1931, t. **7**, p. 5, et *Zeutr. Bakt. Parasitenk*, 1931, t. **2**, Abt. 84, p. 193 à 195.
- [276] TOLLENS et WHEELER. — *Ber. Chem. Ges.*, 1889, t. **22**, p. 1046.
- [277]¹ TOLLENS. — *Lieb. Ann.*, 1890, t. **260**, p. 304.
- [277]² TOLLENS. — *Lieb. Ann.*, 1889, t. **254**, p. 329.
- [277]³ TOLLENS. — *Ber. Chem. Ges.*, 1896, t. **29**, p. 1202.

- [278] TOLLENS (B.) et F. RORIVE. — *Ber. Chem. Ges.*, 1908, t. **41**, pp. 1783-1787.
- [279] TOLLENS (B.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1908, t. **41**, p. 1788-1790.
- [280] TOLLENS (C.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1908, t. **56**, p. 115.
- [281] TOLLENS (C.). — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1909, t. **61**, p. 95, III.
- [282] TSCHIRCH et GAUCHMANN. — *Arch. der Pharm.* 1908, t. **246**, p. 545.
- [283] TOLLENS (C.) et F. STERN. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1910, t. **64**, p. 39.
- [284] UDRANSKY. — *Ztschr. für phys. Chem.*, 1888, t. **12**, p. 358-385.
- [285] UIWA (T.). — *Acta. phytochim.*, 1932, t. **6**, p. 155.
- [286] VELLUZ (L.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1933, t. **18**, p. 109.
- [287] WIEDMANN (C.). — *Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1877, t. **6**, p. 216.
- [288] WIENMANN (F.). — *Ber. chem. Ges.*, 1929, t. **62**, p. 1637.
- [289] WIENMANN (F.). — *Biochem. Ztschr.*, 1931, t. **236**, p. 87.
- [290] WILLSTATTER (R.) et C. SCHUDEL. — *Ber. Chem. Ges.*, 1918, t. **51**, p. 780.
- [291] WURTZ (A.). — *Dictionnaire de chimie pure et appliquée*, 2^e supplément, 1901, t. **4**, p. 896.
- [292] WIDMARK (E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, t. **10**, p. 669.
- [293] WINOKUROW. — *Ber. Biochem. Inst. (Ukraine)*, 1925, t. **1**.
- [294]₁ WEST (E.-S.) et V.-L. PETERSON. — *Biochem. Journ.*, 1932, t. **26**, p. 1720.
- [294]₂ WEST (E.-S.), A.-C. LANGE et V.-L. PETERSON. — *Biochem. Journ.*, 1932, t. **26**, p. 1728.
- [294]₃ WEST (E.-S.) et A. STEINER. — *Biochem. Journ.*, 1932, t. **26**, p. 1742.

- [295] SCHOEFFEL (E.) et K.-P. LINK. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, t. **100**, p. 397.
- [296] MOREL (A.). — *Précis de technique chimique*, Collection Testut, Doin, Paris, 1909.
- [297] ADELINE. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* (1927), t. **25**, p. 8.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	13

PREMIERE PARTIE

<i>Préparation, Propriétés, Conjugés glycuroniques.....</i>	<i>27</i>
PRÉPARATION	29
I. — A partir de produits naturels.....	31
A. — Acide euxanthique du Jaune Indien.....	31
B. — A partir de l'Amidon.....	34
C. — Acide aldobionique de la Gomme arabique	34
II. — Préparations par synthèse chimique.....	45
A. — Réduction de la lactone saccharique.....	45
B. — Oxydation des oses (glucose).....	48
1° Oxydation par l'eau oxygénée.....	49
2° Oxydation par l'acide nitrique.....	50
C. — Oxydation des hétérosides (Glucosides)....	51
1° Méthode de Bergmann et Wolff.....	52
2° Méthodes diverses	53
III. — Préparations par synthèse biologique. Observa-	
tions personnelles	55
A. — Au moyen du camphre.....	55
B. — Au moyen du menthol.....	56
PRÉPARATION DE L'ACIDE GLYCURONIQUE CRISTALLISÉ A PAR-	
TIR DU MENTHOLGLYCURONIDE (Ehrlich et Rehorst)	
(1925-1929)	61
C. — Au moyen du bornéol. Observations per-	
sonnelles	65

1° Choix de la substance glycurogénique	66
2° Isolement du bornylglycuronide.....	70
a) Précipitation du bornylglycuronate de zinc	70
b) Libération et purification du bornyl- glycuronide	82
3° Hydrolyse du bornylglycuronide.....	86
4° Purification de l'acide glycuronique..	89
5° Préparation de la lactone glycuronique	89
IV. — Conclusion	91
PROPRIÉTÉS PHYSIQUES	97
I. — De l'acide glycuronique.....	37
II. — De la lactone ou glycurone.....	99
PROPRIÉTÉS CHIMIQUES	103
I. — Constitution chimique. Les acides uroniques....	103
II. — Propriétés liées à sa nature glucidique.....	111
A. — Propriétés réductrices,.....	111
1° Oxydation par les halogènes, l'acide nitrique, etc.	111
2° Oxydation par les hydrates métalliques en milieu alcalin	113
3° Oxydation par divers composés.....	114
B. — Ethérification. Conjugaison. Les uronides	115
1° Ethers-oxydes	115
2° Ethers-sels	116
3° Les uronides	116
C. Réactions colorées	117
1° Communes avec les pentoses ou non caractéristiques	117
2° Plus caractéristique de l'acide glycu- ronique	124
D. — Action des acides, des alcalis. Réactions diverses	125

E. — Combinaisons avec le groupement —NH^2	126
F. — Produits de condensation: les acides polyglycuroniques, les polyuronides, les acides aldobioniques	128
III. — Propriétés liées à sa fonction acide.....	131
A. — Sels de l'acide glycuronique.....	131
B. — Ethers-Sels	135
LES CONJUGUÉS GLYCURONQUES (Glycuronides).....	137
I. — Classification	137
II. — Méthodes de préparation.....	140
III. — Propriétés générales	142

DEUXIEME PARTIE

<i>Les Méthodes de recherche et de dosage.....</i>	<i>147</i>
EXAMEN QUALITATIF	149
I. — Réaction colorée à la naphtorésorcine.....	149
A. — Modifications diverses de la technique....	152
B. — Applications aux liquides biologiques....	156
II. — Combinaisons parabromophénylhydraziniques ..	163
III. — Combinaisons avec la phénylhydrazine.....	171
EXAMEN QUANTITATIF	177
I. — Observations préliminaires	177
II. — Temps de la technique	178
III. — Exposé des méthodes	179
A. — Méthodes polarimétriques	180
B. — Méthodes colorimétriques	180
C. — Méthodes chimiques	182
1° Dosage à l'état de saccharate d'argent	183
2° Dosage alcalimétrique	184
3° Dosage par distillation avec ClH ou SO^4H^2	184

α. Dosage par détermination du fur- furol	184
β. Dosage par détermination de l'anhy- dride carbonique	188
4° Dosages basés sur le pouvoir réduc- teur de l'acide glycuronique libre..	192

TROISIEME PARTIE

<i>Applications cliniques. Etat naturel. Métabolisme.....</i>	201
APPLICATIONS CLINIQUES	203
I. — Bases physiologiques	204
II. — Résultats	205
III. — Conclusions	210
<i>Etude des lésions du foie et des reins chez les animaux d'expériences, utilisés pour la production des conjugués</i>	211
ETAT NATUREL	214
I. — Dans le règne végétal. Les polyuronides.....	214
A. — Gommess végétales	216
B. — Mucilages	221
C. — Hémicelluloses	223
D. — Saponines	225
E. — Les polyuronides bactériens.....	226
II. — Dans le règne animal	227
A. — Tissus de soutien animaux	227
B. — Liquides de l'organisme	228
MÉTABOLISME	231
I. — Lieu de formation.....	231
II. — Mécanisme de production	232
III. — Rôle dans l'organisme	235
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	239
BIBLIOGRAPHIE	243

